Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Immuncytochemische und histochemische Untersuchungen am Inselorgan steroiddiabetischer Ratten

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SONJA TEICHMANN-DÖRR, geb. Teichmann
aus Opava

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0116

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Immuncytochemische und histochemische Untersuchungen am Inselorgan steroiddiabetischer Ratten

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SONJA TEICHMANN-DÖRR, geb. Teichmann
aus Opava

1986

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. Chr. Klessen
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. P. T. Ammon

gedruckt 1986 bei H.-J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung....1

2. Material und Methoden....3
2.1. Versuchstiere, Triamcinolon-Applikation, Materialgewinnung....3
2.2. Immunhistochemische Nachweistechniken....4
2.3. Histochemische Untersuchungsmethoden....6
2.4. Insulinbestimmung....7
2.5. Glucosebestimmung....7
2.6. Morphometrie....8

3. Befunde....9
3.1. Allgemeine Beobachtungen....9
3.1.1. Glucosespiegel....9
3.1.2. Insulinspiegel....9
3.1.3. Gewichtsverlauf....10
3.2. Histologie des Inselorgans....10
3.2.1. Größe und Form der Inseln....10
3.2.2. Immuncytochemische Befunde....11
3.3. Das Inselorgan der diabetischen Ratten....12
3.3.1. B-Zellen....12
3.3.2. A-Zellen....12
3.3.3. D- und PP-Zellen....13
3.4. Histochemische Befunde....13
3.4.1. Nachweis von Glykogen....13
3.4.2. Darstellung der zytoplasmatischen Ribonukleinsäure (RNS)....14
3.4.3. Darstellung basophilen Materials in den Inselzellen....14

4. Diskussion....16
4.0. Vorbemerkung....16
4.1. Morphologie der Pankreasinseln....16
4.2. Zwei Typen von B-Zellen....17
4.3. Insulinsynthese....17
4.4. Insulinfunktion....18
4.5. Funktion der A-Zellen....18
4.6. Funktion der D-Zellen....18
4.7. Funktion der PP-Zellen....19
4.8. Regulation und Freisetzung der Inselhormone....20

4.9. Der experimentelle Diabetes mellitus.....21
4.10. Morphologische und immuncytochemische Veränderungen an den Pankreasinseln der diabetischen Ratten.....24
4.11. Glykogen im Inselorgan bei Diabetes mellitus.....27
4.12. Basophiles Material in den B-Zellen des Inselorgans.....28
5. Zusammenfassung.....32
6. Literaturverzeichnis.....34
7. Bildteil mit Abbildungslegenden.....42

1. EINLEITUNG

Die Pankreasinseln wurden 1896 von Paul Langerhans entdeckt. In seiner Dissertation beschreibt er sie als "...zu rundlichen Häuflein gescharrte Zellen, in regelmäßigen Abständen im Parenchym...der Drüse verteilt". Er muß jedoch einräumen, "...dass ich mich selbst einer Hypothese über den Charakter und Werth unserer Zellen enthalten muß".

Daß das Pankreas an der Regulation des Glukosespiegels beteiligt ist, konnten Mering und Minkowski (1889) zeigen. Sie entfernten Hunden die Bauchspeicheldrüse, worauf diese einen Diabetes entwickelten. Nach subcutaner Reimplantation von Pankreasstückchen bei pankreatektomierten Hunden normalisierte sich der Blutzuckerspiegel, bei Entfernung des Implantates entwickelte sich wieder eine Hyperglykämie.

Einen ersten Hinweis dafür, daß es die Inseln der Bauchspeicheldrüse sein müssen, die das "Blutzuckersenkende Prinzip" enthalten, ging aus Untersuchungen von Ssobolew (1902) hervor. Dieser unterband bei Hunden den Ausführungsgang der Bauchspeicheldrüse nahe seiner Mündung ins Duodenum. Nach einiger Zeit entwickelte sich eine ausgesprochene Atrophie des exokrinen Teils der Bauchspeicheldrüse, die Inseln blieben jedoch völlig intakt und der Blutglukosespiegel bewegte sich im Normbereich.

Auch Banting und Best, die Entdecker des Insulins, bedienten sich dieses experimentellen Ansatzes - Verödung des exokrinen Pankreasparenchyms - um aus dem verbleibenden Inselmaterial das "antidiabetische Prinzip" zu isolieren. Dies gelang ihnen am 27.Juli 1922. Der gewonnene Extrakt vermochte den erhöhten Blutzuckerspiegel bei einem zuvor pankreatektomierten Hund zu senken.

Es zeigte sich dann auch, daß die Inseln nicht nur Insulin, sondern noch weitere Hormone bilden: Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid. Mit der Fortentwicklung der histologischen - histochemischen Techniken gelang es, die zunächst einheitlich erscheinenden Inselzellen weiter zu differenzieren. So konnte erstmals Lane (1907) zwei verschiedene Zelltypen im Pankreas beschreiben. Er grenzte sie aufgrund ihrer Zellgröße, der Struktur ihrer Sekretgranula sowie der unterschiedlichen

Löslichkeit der Granulainhalte voneinander ab und nannte sie A- und B-Zellen. Später erfolgte die Beschreibung der D-Zellen (Bloom 1931) und der pankreatisches Polypeptid (PP)bildenden sog. PP-Zellen (Larsson et al. 1975).

Ein entscheidender Fortschritt in der Zuordnung der Hormonbildung zu jeweils individuellen Inselzelltypen wurde mit der Entwicklung und Anwendung immuncytochemischer Techniken erreicht. Erst mittels dieser Technik wurde der endgültige Beweis für die Existenz funktionell unterschiedlicher Inselzelltypen erbracht.

Wesentliche Fortschritte für das Verständnis des Diabetes mellitus brachte die Anwendung diabetogener Substanzen im Tierexperiment. Auf diese Weise wurde es möglich, nach Applikation eines diabetogenen Agens die sich ergebenden morphologischen Veränderungen der Pankreasinseln in Beziehung zu setzen zu pathophysiologischen Ereignissen bzw. zur diabetischen Stoffwechselsituation. Hierdurch gelang es, Einblicke in die Pathogenese des Diabetes mellitus zu gewinnen.

Im allgemeinen werden im Tierexperiment zwei verschiedene diabetogene Substanztypen verwendet. Zum einen Alloxan und Streptozotozin, Stoffe, die durch eine irreversible B-Zellnekrose einen Insulinmangel hervorrufen. Zum anderen können auch Glucocorticoide einen Diabetes mellitus induzieren (Ingle 1941), wobei sich die diabetische Stoffwechsellage nach entsprechender Anpassung des Inselorgans unter Umständen normalisieren kann. Der durch Glucocorticoide induzierte Diabetes mellitus ist von besonderem Interesse, da Arzneistoffe aus dieser Wirkstoffgruppe weite therapeutische Anwendung finden.

In der vorliegenden Untersuchung soll mit Hilfe immuncytochemischer und histochemischer Methoden die Anpassungs- und Regenerationsfähigkeit der Inselzellen unter vorübergehender diabetischer Stoffwechsellage,die durch Triamcinolon-A-Kristallsuspension hervorgerufen wird, untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere, Triamcinolon-Applikation, Materialgewinnung

Die Untersuchung wurde an 300g bis 400g schweren adulten männlichen Ratten vom Stamm Sprague-Dawley (Voss KG/Tuttlingen) durchgeführt, die zur Adaptation eine Woche vor Versuchsbeginn am Untersuchungsort eintrafen. Alle Tiere bekamen während der gesamten Versuchsdauer Altromin^{R} Standardnahrung sowie Wasser ad libitum.

Zu Versuchsbeginn wurden die 28 Ratten in sieben Gruppen zu je vier Tieren eingeteilt - drei Versuchstiere und ein Kontrolltier. Am ersten Versuchstag bekamen alle Versuchstiere je 2mg Triamcinolon A-Kristallsuspension (TA-KS)*, die Kontrolltiere eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung im Bereich des Rückens in leichter Äthernarkose subcutan injiziert. Vom ersten Versuchstag an erfolgte bei allen Tieren eine tägliche Gewichts- und Blutzuckerkontrolle. Die Applikation von TA-KS bzw. der physiologischen Kochsalzlösung, die Gewichts- und Blutzuckerbestimmung sowie die Tötung der Tiere erfolgte stets zur gleichen Tageszeit zwischen 10^{00}und 12^{00} Uhr.

Am 1., 2., 3., 5., 7., 10. und 14. Tag post injectionem (p.i.) wurde je eine Gruppe von drei Versuchstieren und einem Kontrolltier mit Äther in Tiefnarkose gebracht. Nach vorhergehender Heparinisierung mit 0,2ml Natrium-Heparin (1000 IE),in den linken Ventrikel injiziert, wurde durch Punktion des rechten Ventrikels Vollblut gewonnen; hiervon wurde durch Zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5414, 12000 Umdrehungen/min., 3 Min.lang) Plasma zur Insulinbestimmung gewonnen. Das Plasma blieb bis zur Insulinbestimmung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Rattenpankreas wurde ca. eine halbe Stunde in situ im Fixierungsgemisch nach Bouin vorfixiert (Romeis, 1968, §304), anschließend mitsamt der Milz und dem Duodenum entnommen und 24 Stunden lang weiterfixiert. Nach Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe über Methylbenzoat und Benzol in Paraplast überführt und 48 Stunden später der duodenumnahe bzw. milznahe Pankreasteil getrennt in Paraplast eingebettet.

*Für die Herstellung von 1mg TA-KS-Ampullen bedanke ich mich bei der Firma Squibb-Heyden/München.

6µ dicke Schnitte wurden auf Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgezogen (Pappas 1971, in der Modifikation nach Klessen und Rehbein 1974). An je zwei Schnitten von jedem Tier (milz- und duodenumnah) wurden - und zwar jeweils gleichzeitig für alle Tiere - immunhistochemische Reaktionen zur Darstellung von Insulin, Glucagon und Somatostatin durchgeführt. Die Darstellung von pankreatischem Polypeptid erfolgte ebenfalls für alle Tiere und zwar lediglich am duodenumnahen Pankreasgewebe.

2.2. Immunhistochemische Nachweistechniken

Die immunhistochemische Darstellung der Hormone Insulin, Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid (PP) wurde mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nach Sternberger (1979) durchgeführt, die als eine modifizierte "Double-Bridge-Methode" aufzufassen ist.

Hierbei wird das Gewebe 24 Std. bei 4°C mit dem für das darzustellende Antigen spezifischen, hoch verdünnten Antikörper (1.AK) bzw. Antiserum inkubiert. Nach Abspülen des 1.AK und dreimaligem Waschen des Schnittes im PBS-Puffer pH 7.6 (Williams 1977) wird für 45 Min. ein gegen den 1.AK gerichteter 2.AK bzw. Antiserum aufgetragen. Nach erneuter dreimaliger Waschung im PBS-Puffer erfolgt eine 45-minütige Inkubation mit dem von Sternberger entwickelten Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (PAP-Komplex). Hierbei handelt es sich um einen stabilen zyklischen Komplex aus drei Peroxidase- und zwei Antiperoxidasemolekülen, wobei die Antiperoxidase von der gleichen Tierspezies stammt wie der 1.AK. Die Peroxidase wird mit Diaminobenzidin (Graham und Karnovsky 1966) nachgewiesen.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wird der Schnitt vor der Applikation des 1.AK mit H_2O_2 in PBS-Puffer inkubiert; zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen zwischen dem im Überschuß applizierten 2.AK und den Gewebsantigenen wird der Gewebsschnitt mit dem Normalserum der den 2.AK produzierenden Tierspezies inkubiert, ebenfalls vor der Applikation des 1.AK.

Eine schematische Übersicht der PAP-Reaktion zeigt die Abb.1.

Insulindarstellung

1. 30 Min. Inkubation mit 2ml H_2O_2 in 200ml PBS-Puffer, pH 7.6
2. 3 mal 5 Min. spülen in PBS-Puffer
3. 10 Min. Inkubation mit normalem Kaninchenserum 1:30 mit PBS verdünnt (Byk-Mallinckrodt); vor Gebrauch 30 Min.bei 57°C dekomplementieren
4. Abtropfen
5. 1. Antiserum: Meerschweinchen-Anti-Insulin 1:10 000 (Novo) über Nacht in feuchter Kammer bei 4°C
6. Spülen wie bei 2.
7. 2. Antiserum: Kaninchen-Anti-Meerschweinchen-IgG 1:30 mit PBS (Dynatech), 45 Min.
8. Spülen wie bei 2.
9. 45 Min. Meerschweinchen PAP (Fresenius) 1:5 mit PBS
10. Spülen wie bei 2.
11. DAB-Medium unter mikroskopischer Kontrolle (2,5mg DAB in 10ml PBS-Puffer lösen, filtrieren, pH auf 7.6 einstellen, 50ml H_2O_2(30%) zugeben
12. Spülen wie bei 2.
13. 5 Min. osmieren mit 1%iger OsO_4-Lösung
14. 3 mal 5 Min. spülen in Ampuwa
15. Entwässern und eindecken in Eukitt

Glukagon-, Somatostatin- und PP-Darstellung

1. und 2. wie oben
3. 10 Min. Inkubation mit normalem Schafserum (Byk-Malinckrodt); Verdünnung und Dekomplementierung wie oben
4. Abtropfen
5. Kaninchen-Anti Glukagon (Novo) 1: 2 000 mit PBS, bzw. Kaninchen-Anti-Somatostatin (Ferring) 1: 7 500 mit PBS, bzw. Kaninchen-Anti-PP (Novo) 1:4 000 mit PBS über Nacht in feuchter Kammer bei 4°C
6. Spülen wie oben
7. Schaf -Anti-Kaninchen-IgG (Chemie Brunschwig AG) 1:30 mit PBS 45 Min.
8. Spülen wie oben
9. 45 Min. Kaninchen PAP (Medac) 1:60 mit PBS

10. bis 15. wie oben

Die für die verwendeten Antikörper optimalen Verdünnungen wurden in Vorversuchen ermittelt.- Kontrollreaktionen erfolgten durch:

1. Applikation vom Normalserum anstelle des 1.AK
2. für Insulin darüberhinaus noch durch Adsorption des 1.AK (1:5 000) mit dem spezifischen Antigen (0,1%) über Nacht bei 4°C, Antiserum und die Antigenlösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt.

2.3 Histochemische Untersuchungsmethoden

Glykogennachweis

Zum Glykogennachweis wurden folgende Reaktionen durchgeführt: Perjodsäure-Schiff-(PAS-)Reaktion (McManus 1946, modifiziert nach Graumann 1954); Bleitetraacetat-Schiff-(BTS-)Reaktion (Crippa 1951, in der Modifikation nach Malinin 1976). Die Herstellung des Schiffschen Reagens erfolgte nach Graumann (1953) unter Verwendung von basischem Pararosanilin (Base, Merck). Zur Abgrenzung von Glykogen gegenüber ebenfalls positiv reagierenden Glykoproteinen wurde der α-Amylase-(Diastase)Test durchgeführt (Lillie und Greco 1947, nach Graumann und Clauss 1959). Hierbei wurden die Gewebsschnitte mit Glykogen abbauender α-Amylase (Diastase 2500 IE/g Merck) in einer 1%igen wässrigen Lösung 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Kontrollschnitte wurden unter sonst identischen Bedingungen (Zeit, Temperatur) mit enzymfreier Lösung inkubiert.

Darstellung der cytoplasmatischen Ribonukleinsäure (RNS) mit Gallocyanin- Chromalaun (Pearse 1968) unter Einschluß des Ribonukleasetests (Arnold 1968).

Ribonukleasetest: zum Nachweis der RNS wurden die Gewebsschnitte vor der Färbung mit 0,025%iger wässriger Ribonukleaselösung (Serva) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollschnitte wurden unter sonst identischen Bedingungen in enzymfreier Lösung inkubiert.

Eisenbindungsreaktion

Darstellung des basophilen Materials der Inselzellen mit der Eisenbindungsreaktion EBR (Hale 1946, Graumann und Clauss 1958, modifiziert)

mit und ohne Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit Kaliumhydroxid (KOH-EBR), 0,5%ig in 80%igem Äthanol, 10 Min. bei Zimmertemperatur (Sorvari und Stoward 1971, Klessen 1978).

Zur Identifizierung von Sialinsäureresten wurde der Sialidasetest durchgeführt (Pearse 1972, verändert nach Klessen 1973). Hierbei wurden die Gewebsschnitte bei 37°C in der feuchten Kammer 12 bzw.18 Stunden mit Neuraminidase (rein aus Vibrio Cholerae, Behring, 1 I.U./ml) inkubiert, welche 1:1 mit 0,05 M Acetatpuffer pH 5.5, enthaltend 1% NaCl und 0,1% $CaCl_2 \cdot H_2O$, verdünnt wurde. Kontrollschnitte wurden entsprechend mit enzymfreier Pufferlösung inkubiert.

Außerdem wurde im Zusammenhang mit der EBR bzw. KOH-EBR der Diastase- und Ribonukleasetest durchgeführt (s.o.).

Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE, Romeis 1968, §651, 703).

Die histochemischen Reaktionen wurden am Pankreasgewebe von jeweils mindestens einem Versuchstier pro Gruppe sowie jeweils einem Kontrolltier durchgeführt.

2.4. Insulinbestimmung

Die Insulinbestimmung erfolgte mit dem Insulin Radioimmunoassay Kit der Sorin Biomedica, Saluggia (Italien)*. Das Prinzip des Assays basiert auf der Verdrängung von markiertem Insulin durch unmarkiertes Insulin des Standardserums bzw. der Probeseren von quantitativ festgelegten und limitierten Antikörpern. Nach der Inkubation ist die Menge des gebundenen markierten Insulins proportional der in den Probeseren vorhandenen Menge des unmarkierten Insulins.

2.5. Glukosebestimmung

Die Blutzuckerbestimmung erfolgte mit Hilfe des Reflocheck-Geräts** (Boehringer), mit der man reflektionsphotometrisch Glukosewerte im Bereich von 20mg% bis 450mg% messen kann.

* Für die Bestimmung des Plasmainsulinspiegels danke ich Frau Hagenloh, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen.

**Für die Bereitstellung des Geräts bedanke ich mich bei der Firma Boehringer.

2.6. Morphometrie

Der relative Inselgewebsanteil am gesamten Pankreasgewebe wurde mit Hilfe eines 100-Punkte Gitterokulars unter Berücksichtigung der Schrumpfspalten an H.E.gefärbten Präparaten ermittelt. Zu Beginn der Zählung wurde zum Vergleich bei je drei diabetischen Tieren derselben Versuchsgruppe sowie bei drei Kontrolltieren ein 400-Punkte-Gitterokular verwendet. Der Vergleich der mit beiden Gittern ermittelten Daten ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied . Beim Auszählen wurde das Gitter stets eine Gitterbreite nach rechts und eine nach oben bzw. unten bewegt. Kleine Schnitte wurden vollständig ausgezählt. Der Schrumpfspaltenanteil wurde vom Gesamtgewebe abgezogen und hiervon der prozentuale Inselanteil errechnet.

3. BEFUNDE

3.1 Allgemeine Beobachtungen

3.1.1 Glukosespiegel

Alle Versuchstiere entwickelten innerhalb von 24 Stunden nach erfolgter TA-KS-Applikation eine Hyperglykämie, die bis zum dritten Tag p.i. an Stärke zunahm (der Blutzuckerspiegel erreichte Werte um 350 mg%). Danach nahm der Glukosespiegel allmählich ab und kehrte etwa am siebten Tag zur Norm zurück (Abb. 2).

3.1.2 Insulinspiegel

Parallel zum Glukosespiegel bewegte sich der Plasmainsulinspiegel (Tab. 1). Der Plasmainsulinspiegel der diabetischen Tiere stieg im Vergleich zu jenem der Kontrolltiere deutlich bis zum dritten Tag an, blieb erhöht auch noch am fünften Tag und kehrte ab dem siebten Tag wieder zur Norm zurück. Der Insulinspiegel des Kontrolltieres der Gruppe VII sowie des Versuchstieres 2 der Gruppe VII lag weit über dem Normbereich. Diese Streuung der Plasmainsulinspiegel ist vermutlich methodisch bedingt, wobei neben der direkten Insulinbestimmung möglicherweise auch unterschiedlich stark ausgeprägte Streßsituationen der Tiere während der Narkose und Blutentnahme eine Rolle spielen.

Tabelle 1: Plasmainsulinspiegel (uU/ml)

Tier	Gruppe						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	264	525	605	645	750	99	94
2	400	685	494	467	197	117	375
3	400	548	511	635	201	n.b.	54
4	69	224	198	158	91	256	650

[1] Die Ziffern I-VII bezeichnen die Gruppen diabetischer Tiere jeweils zum Zeitpunkt nach Triamcinolon-Applikation (1.,2.,3.,5.,7.,10. und 14. Tag p.i.). 1-3 Versuchstiere, 4 Kontrolltiere der jeweiligen Gruppen. - "n.b." = nicht bestimmt.

3.1.3 Gewichtsverlauf

Mit dem Einsetzen der Hyperglykämie ging ein Gewichtsverlust der Versuchstiere einher. Sie verloren bis zum fünften Tag an Gewicht (bis zu 20% ihres Ausgangsgewichtes). Am sechsten Tag setzte eine - im Vergleich zu den Kontrolltieren verstärkte - Gewichtszunahme ein. Am Versuchsende erreichten die Tiere annähernd wieder ihr Ausgangsgewicht (Abb. 3). Lediglich das Tier Nr. 2 der Gruppe VII zeigte eine verminderte Erholungsbereitschaft: sein Gewicht lag am Versuchsende (14. Tag) immer noch 18% unter dem Ausgangsgewicht. Bei der Graphik der Abb. 3 bleibt dieses Tier unberücksichtigt. - Die makroskopische Begutachtung der Bauchspeicheldrüse sowie weiterer Abdominalorgane (Leber, Niere, Magen, Milz) ergab, mit Ausnahme des Tieres Nr. 2 der Gruppe VII, keine Auffälligkeiten gegenüber den Kontrolltieren. Bei dem genannten Tier wurden makroskopisch Lungenabszesse beobachtet.

3.2. Histologie des Inselorgans

3.2.1. Größe und Form der Inseln

Lichtmikroskopisch konnte man schon ab dem zweiten Tag eine starke zahlenmäßige Zunahme der Inseln beobachten, zunächst der sehr kleinen und kleinen (3-10 bzw. bis zu 50 Zellen), ab dem dritten Tag durch fortdauernde Proliferation auch der mittelgroßen, zwischen dem siebten und zehnten Tag der sehr großen Inseln. Der relative Inselgewebsanteil am Gesamtparenchym nahm ab dem zweiten Tag kontinuierlich zu und stabilisierte sich zwischen dem zehnten und vierzehnten Tag auf etwa dem zweieinhalbfachen des Ausgangswertes (Abb. 4).

Mit der Stärke der Inselgewebsproliferation nahm auch die Häufigkeit der Inselzellmitosen zu, wobei es sich zumeist um B-Zellen zu handeln schien. Während diese noch am ersten Tag p.i., ähnlich wie bei den Kontrolltieren, nur ganz vereinzelt zu beobachten waren, nahm ihre Häufigkeit ab dem zweiten Tag kontinuierlich zu, erreichte am fünften Tag ihren Höhepunkt mit mindestens einer, häufig mehreren Mitosen in praktisch jeder mittelgroßen oder großen Insel (Abb.5)* und nahm wieder allmählich ab. Am zehnten bzw. vierzehnten Tag konnte man keine erhöhte Mitoseaktivität im Inselorgan der Versuchstiere im Vergleich zu jener der Kontrolltiere beobachten.

*Hier sowie bei den weiteren Abbildungen wird jeweils ein repräsentatives Bild gezeigt.

Die kleinen und mittelgroßen Inseln sind bei beiden Gruppen rundlich bis leicht oval. Die sehr großen Inseln können bei den Versuchstieren geradezu bizarre Formen annehmen (bohnen-, paragraphen-, V-förmig oder gar perlschnurartig), während sie bei den Kontrolltieren meist länglich und etwas eingebuchtet erscheinen.

3.2.2. Immuncytochemische Befunde

Am Inselorgan der Ratte lassen sich mit immunhistochemischer Technik vier verschiedene endokrine Zelltypen abgrenzen: die Insulin produzierenden B-Zellen, die Glukagon produzierenden A-Zellen, die Somatostatin produzierenden D- Zellen und die pankreatisches Polypeptid (PP) produzierenden PP-Zellen. Je nach ihrer Zellzusammensetzung kann man am normalen Rattenpankreas zwei Inseltypen unterscheiden: die milznahen oder Glukagon-reichen und die duodenumnahen oder an PP-Zellen reichen Inseln (Abb. 6,7). Die ersteren finden sich im Pankreasschwanz, -körper sowie proximalen Pankreaskopfteil, d.h.dem Pankreasteil, der ursprünglich aus der dorsalen Duodenalknospe hervorgeht. Die an PP-Zellen reichen Inseln finden sich im distalen Pankreaskopfteil; dieser entwickelt sich aus der ventralen Duodenalknospe.

In beiden Inseltypen bilden die im Zentrum gelegenen B-Zellen die Hauptmasse (Abb. 8). Sie werden in den milznahen Inseln von einem Saum von A-Zellen, in den duodenumnahen Inseln vorwiegend von PP-Zellen umgeben. In der Zone zwischen den A- bzw. PP-Zellen und den B-Zellen liegen, auf beide Inseltypen gleichmäßig verteilt, die meist deutlich polygonalen, mit oft längeren Zellausläufern versehenen D-Zellen (Abb. 9).

Die B-Zellen sind bei den Kontrolltieren meist gleichmäßig rund bis oval, selten mit Fortsätzen versehen, entsprechend dem Kapillarverlauf gewunden in zwei oder mehreren Reihen angeordnet. Die runden Kerne liegen oft in der Zellmitte, bei zweireihigen Zellbalken sind sie am kapillarfernen Pol gelegen. Die A-Zellen sind kleine ovale Zellen mit rundlichen bis leicht ovalen Zellkernen. Seltener vereinzelt, meist in Reihen oder Gruppen dicht zusammengedrängt, umsäumen sie gleichsam girlandenförmig mit kleinen oder größeren Unterbrechungen die B-Zellen. Die PP-Zellen sind kleinere längliche Zellen mit langen, schmalen Fortsätzen, über die sie Kontakt sowohl zu den Kapillaren als auch zu benachbarten Zellen

aufnehmen. Die D-Zellen sind in ihrer Form im Vergleich zu den PP-Zellen eher plumper. Sie sind ebenso wie jene mit Fortsätzen versehen, die zu den Kapillaren, aber auch zu den benachbarten Zellen, ziehen können.

Alle vier endokrinen Zelltypen kommen auch als Einzelzellen im exokrinen Teil des Pankreas vor. Darüberhinaus sind sie auch in der Adventitia großer Gefäße sowie in den Wänden der Ausführungsgänge darstellbar, wobei es die PP-Zellen sind, die man am häufigsten außerhalb der Inseln findet.

3.3. Das Inselorgan der diabetischen Ratten

3.3.1. B-Zellen

Die B-Zellverbände lockern sich bei den diabetischen Tieren deutlich auf. Die B-Zellen hypertrophieren, ihre Zellkerne sind ebenfalls vergrößert, es können alle Mitosestadien beobachtet werden. Die Zellen weisen eine größere Formenvielfalt auf, sie können oval, polygonal sein, bisweilen länglich oder gar mit plumpen Fortsätzen versehen, die dicht aneinandergedrängt zu den Kapillaren ziehen.

Bereits innerhalb von 24 Stunden kommt es bei den diabetischen Ratten zu deutlicher Insulinausschüttung, die an der verminderten Reaktionsintensität erkennbar ist (Abb.10). Die B-Zellen-Degranulierung erfaßt zunächst die größeren, ab dem zweiten Tag zunehmend auch die kleineren Inseln. Es finden sich allerdings stets vereinzelt liegende, stark positiv reagierende Zellen sowie innerhalb der größeren Inseln neben degranulierten auch positiv reagierende Zellgruppen (Abb.11).

Ab dem siebten Tag nimmt die Granulierung der B-Zellen wieder zu, am zehnten bzw. vierzehnten Tag weisen alle Inseln eine starke Reaktionsintensität auf, die diejenige der Kontrolltiere z.T. übertrifft (Abb.12).

3.3.2. A-Zellen

Bei dem A-Zellen-Mantel kommt es während der Versuchsdauer zu einer in den ersten Tagen kaum merklichen, später zunehmenden, am zehnten und vier-

zehnten Tag deutlich erkennbaren Auflockerung des peripheren Zellsaums. Am vierzehnten Tag liegen die A-Zellen größtenteils einzeln am Inselrand oder sind sogar von diesem von den B-Zellen ins Inselinnere abgedrängt (Abb. 13). Bei den tangentialen Inselanschnitten sind die A-Zellanhäufungen weitgehend von den B-Zellen durchbrochen. Eine Veränderung der Reaktionsintensität der A-Zellen läßt sich nicht nachweisen.

3.3.3 D- und PP-Zellen

In der vorliegenden Studie ließ sich mit der immuncytochemischen Technik keine Veränderung der Reaktionsintensität sowie der Zellform, weder bei den D-Zellen noch bei den PP-Zellen, nachweisen.

3.4. Histochemische Befunde

3.4.1 Nachweis von Glykogen

Geringe Glykogenmengen lassen sich in den B-Zellen einzelner Inseln bereits ab dem zweiten Tag nachweisen. Das Glykogen nimmt vom dritten bis zum fünften Tag an Quantität deutlich zu (Abb.14), am siebten Tag sind wiederum nur noch geringe Glykogenmengen darstellbar. Ab dem zehnten Tag läßt sich mit den verwendeten Farbreaktionen kein Glykogen mehr in den Inseln der diabetischen Ratten nachweisen. Bei den Kontrolltieren fällt der Glykogennachweis in den Inseln stets negativ aus.

Das Glykogen liegt in den Inselzellen in Form von feineren und gröberen Granula vor. Vielfach läßt sich eine deutliche Glykogenflucht beobachten; hierbei verlagern sich die Glykogengranula innerhalb der Zellen an einen Zellpol oder innerhalb der Inseln, die Zellgrenzen überschreitend, an einen Inselpol, wobei sie auch das angrenzende exokrine Pankreas erreichen können.

Außer in den B-Zellen findet sich Glykogen noch in den Wänden der Inselkapillaren sowie im Gefäß- und Gangsystem des exokrinen Pankreas.

Ein Vergleich der PAS- mit der BTS-Reaktion ergibt keine Unterschiede, weder hinsichtlich der Reaktionsintensität noch hinsichtlich der Menge des nachweisbaren Glykogens. Besonders intensiv lassen sich die Glykogengranula in

den B-Zellen anfärben, wenn die Gewebsschnitte vor Durchführung der Eisenbindungsreaktion mit aethanolischer KOH behandelt werden. A-, D- und PP-Zellen erwiesen sich bei diabetischen Tieren und Kontrolltieren stets frei von Glykogen. Die Spezifitätskontrolle für den Glykogennachweis erfolgte durch Vorbehandlung der Schnitte mit Diastaselösung. Danach fiel der Glykogennachweis stets negativ aus (Abb. 15).

3.4.2 Darstellung der zytoplasmatischen Ribonukleinsäure (RNS)

Die Inselzellen der Kontrolltiere zeigen eine schwache, grau-bläuliche homogene Anfärbung des Zytoplasmas und eine deutliche Kernchromatin- sowie Nukleolusanfärbung. In der Zellperipherie der diabetischen Tiere kann man einen stärker blau angefärbten Zellsaum beobachten, der vom ersten bis zum siebten Tag erhalten bleibt. Am zehnten bzw. vierzehnten Tag stellt sich dieser Saum nicht mehr dar, das gesamte Zytoplasma färbt sich, den Kontrolltieren vergleichbar, schwach bläulich homogen an. Nach Vorbehandlung der Schnitte mit Ribonuklease färben sich alle Inselzellen sowohl der diabetischen als auch der Kontrolltiere grau-weißlich an.

3.4.3 Darstellung basophilen Materials in den Inselzellen (Eisenbindungsreaktion mit und ohne KOH-Vorbehandlung)

Abgesehen von den Glykogengranula lassen sich in den B-Zellen diabetischer Tiere mehrere, deutlich basophil reagierende Strukturen darstellen: halbmond- oder kreisförmige Strukturen um den Zellkern der B-Zellen, die vermutlich dem Golgi-Komplex entsprechen, die Membran der Inselzellen, das Zellzytoplasma sowie intrainsuläre Kapillarwände (Abb. 16).

Bei den Kontrolltieren weisen die genannten Strukturen annähernd gleiche Basophilie auf, die kernnahen Bereiche treten nicht bei allen Inselzellen deutlich hervor.

Bei den diabetischen Tieren der Gruppen I bis IV (erster bis fünfter Tag) hingegen ist die Basophilie der kernnahen Bereiche der B-Zellen sowie der Zellmembranen wesentlich stärker ausgeprägt, die Zytoplasmaanfärbbarkeit der B-Zellen hingegen vermindert. Ab dem siebten Tag färbt sich bei den

diabetischen Tieren auch das Zytoplasma der B-Zellen intensiver an, so daß die kernnahen Bereiche wie auch die Zellmembran weniger oder gar nicht hervorgehoben sind. Insgesamt ist die Basophilie aller genannter Strukturen im Inselorgan der Versuchstiere ab dem siebten Tag stärker ausgeprägt als jene der Kontrolltiere.

Die Vorbehandlung der Schnitte mit KOH verstärkt deutlich die Anfärbbarkeit vor allem der kernnahen Bereiche der B-Zellen, wobei die Basophilieverstärkung bei den diabetischen Tieren wesentlich intensiver ist (Abb.17). Nach vorangehender Inkubation der Schnitte mit Neuraminidase ist weder bei den diabetischen Tieren noch bei den Kontrollratten eine EBR-positive Basophilie nachweisbar. Hieraus folgt, daß die mittels der Eisenbindungsreaktion im Inselorgan nachweisbare Basophilie im wesentlichen auf das Vorhandensein von Sialinsäure zu beziehen ist.

4. DISKUSSION

4.0 Vorbemerkung

In dieser Studie sollen morphologische, histochemische und immuncytochemische Veränderungen an den Inselzellen unter experimentell hervorgerufener diabetischer Stoffwechsellage untersucht werden. Durch die Analyse morphologischer und physiologischer Parameter bietet sich die Möglichkeit einer Deutung der formalen Pathogenese eines bestimmten Typus des Diabetes mellitus - des Steroiddiabetes - sowie seines Verlaufes. Die vorübergehende diabetische Stoffwechsellage liefert darüberhinaus Hinweise auf die Regenerationsfähigkeit der B-Zellen. Nicht zuletzt soll diese Arbeit auch ein Beitrag zur Untersuchung der Nebenwirkungen von Triamcinolon A - Kristallsuspension sein, eines Arzneistoffes, der häufig therapeutische Verwendung findet.

Da für das Verständnis der Vorgänge die Kenntnis über den Aufbau der Pankreasinseln, die Funktion der von den einzelnen Inselzelltypen produzierten Hormone sowie die Regulation der Hormonfreisetzung notwendig ist, sei hier zunächst ein kurzer Überblick vorangestellt.

4.1 Morphologie der Pankreasinseln

Erst die Entwicklung von spezifischen Antiseren gegen die vier bislang nachgewiesenen Inselzellhormone und die nachfolgende Applikation der immuncytochemischen Technik auf Schnitte des Pankreasgewebes haben es möglich gemacht, ein funktionell orientiertes Gesamtbild der Pankreasinseln zu entwerfen. Systematische, vorzugsweise am Rattenpankreas durchgeführte Studien haben ergeben, daß man am endokrinen Pankreas zwei Inselarten unterscheiden kann: Die im dorsalen bzw. milznahen Pankreasteil gelegenen Glukagon-reichen Inseln (hierzu gehören der Pankreasschwanz, Pankreaskörper und der superiore Pankreaskopfteil) und die an pankreatischem Polypeptid reichen, im ventralen bzw. duodenumnahen Pankreasteil (inferiorer Pankreaskopfteil) gelegenen Inseln.

Die Hauptmasse beider Inselzelltypen bilden die insulinproduzierenden B-Zellen, die im Inselorgan der Ratte fast den gesamten zentralen Insel-

anteil ausfüllen. Die übrigen Inselzellen umsäumen gleichsam die B-Zellen, bilden einen Zellmantel um sie, wobei sich in den milznahen Inseln überwiegend A- und nur wenige PP-Zellen finden, in den duodenumnahen hingegen vor allem PP- und kaum oder gar keine A-Zellen. Die Somatostatin produzierenden D-Zellen sind etwa gleich auf beide Inseltypen verteilt, sie liegen zwischen den A-und B-Zellen (Orci 1982; s. Abb.18).

4.2 Zwei Typen von B-Zellen

Bei den B-Zellen handelt es sich um rundliche bis ovale Zellen, die in Zellbalken zusammengelagert entlang der Kapillaren angeordnet sind. Auf der elektronenmikroskopischen Ebene lassen sich zwei Typen von B-Zellen als Ausdruck extrem gegensätzlicher Aktivitätszustände unterscheiden: 1. ruhende B-Zellen, charakterisiert durch zahlreiche, von Membranen umschlossene Granula (beta-Granula), die die vorherrschende Komponente im Zellzytoplasma darstellen und deren Form und Elektronendichte speziesabhängig sind. 2. B-Zellen nach protrahierter Stimulation. Diese enthalten wenige Granula, hingegen zahlreiche Mitochondrien, ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum und große Golgi-Komplexe (vgl.Orci 1974).

4.3 Insulinsynthese

Die Insulinsynthese vollzieht sich in den B-Zellen an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums. Dabei entsteht zunächst eine höhermolekulare Vorstufe, das Preproinsulin (Lit. Steiner et al. 1984). Nach Umwandlung in Proinsulin wird dieses unter Vermittlung von Transportvesikeln vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex transportiert, wo die proteolytische Umwandlung von Proinsulin zu Insulin (vermutlich durch membrangebundene Enzyme mit tryptischer und Carboxypeptidase ähnlicher Aktivität) erfolgt. Hierbei werden Disulfidbrücken zwischen A- und B-Ketten gebildet und danach ein Verbindungspeptid (C-Peptid) abgespalten. Die beta-Granula enthalten durch Zinkionen vernetztes Insulin, C-Peptid und ca. 5% Proinsulin. Auf einen Sekretionsreiz hin wird der Granulainhalt bei Anwesenheit von Ca-Ionen und cyclischem AMP abgegeben, wobei die Granulummembran kurzfristig mit der Zellmembran verschmilzt (Exocytose) und nach Entleerung in Form von Vesikeln in die Zelle zurückgenommen wird (vgl.Orci 1974).

4.4 Insulinfunktion

Die auffallendste Wirkung von Insulin ist eine Senkung des normalen oder erhöhten Blutglukosespiegels. Dies geschieht zum einen durch Erhöhung der Zellpermeabilität an den insulinabhängigen Organen, d.h. an Muskel, Fettgewebe und Leber. Darüberhinaus wirkt Insulin als Induktor von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Glykogensynthese sowie des Pentosephosphatzyklus. Durch Aktivitätserhöhung verschiedener Enzyme der Lipidbiosynthese werden weiterhin 30% der mit der Nahrung aufgenommenen Glukose in Lipide umgewandelt. Die oben erwähnte Steigerung der Zellpermeabilität insulinabhängiger Organe führt ebenfalls zu erhöhter Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen unter Insulineinfluß; daneben steigert Insulin auch die Proteinbiosynthese.

4.5 Funktion der A-Zellen

Die A-Zellen sind eher kleiner und oval und in der Inselperipherie in einer bis drei Reihen angeordnet. Sie synthetisieren das Proteohormon Glukagon. Bezüglich seiner Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel gleicht Glukagon dem Adrenalin. Es wirkt jedoch selektiv auf die Leber, Glykogen mobilisierend, d.h. glykogenolytisch; - nicht dagegen auf die Muskulatur. Über eine primäre Aktivierung der Adenylat-Zyklase ruft es eine Aktivitätssteigerung der Leberphosphorylase bei gleichzeitiger Hemmung der Glykogensynthetase hervor und führt somit zur Erhöhung des Blutzuckers. Dieser Effekt wird durch die gleichzeitige Förderung der Glukoneogenese verstärkt. Eine Aktivierung der Fettgewebslipase führt zu vermehrter Bildung von Ketonkörpern. Im Proteinstoffwechsel wirkt Glukagon proteinkatabol - es bewirkt eine Abnahme der Muskelmasse, des Lebergewebes und des Gesamtkörpergewichtes. Die glukoneogenetische wie die glykogenolytische Wirkung von Glukagon wird durch Insulin gehemmt (vgl.Unger et al. 1978).

4.6 Funktion der D-Zellen

Auch die D-Zellen sind kleinere, ovale bis polygonale, mit Zellfortsätzen versehene Zellen. Sie liegen in der Inselperipherie, zumeist zwischen den A- und B-Zellen und treten durch ihre Fortsätze mit diesen

beiden Zelltypen sowie untereinander in Kontakt.

Das von den D-Zellen synthetisierte Tetradecapeptid Somatostatin wurde zuerst im Hypothalamus nachgewiesen. Die Entwicklung und Anwendung des Radioimmunassay sowie immuncytochemischer Techniken zeigte, daß Somatostatin auch in anderen Bereichen des Gehirns, im peripheren Nervensystem sowie in nicht nervalen Geweben wie Gastrointestinaltrakt und Pankreas vorhanden ist.

Die Funktionen des Somatostatins sind sehr vielfältig (Vale et al. 1975). Hier sei nur auf jene des von den D-Zellen synthetisierten Somatostatins eingegangen. Da Somatostatin außergewöhnlich schnell inaktiviert wird und seine Plasmakonzentration entsprechend niedrig ist, wird angenommen, daß die Effektorzellen für Somatostatin in der Nähe der Somatostatin-produzierenden Zellen liegen müssen. Die Somatostatinwirkung kann deshalb nur im Bereich lokaler Zirkulationen, wie etwa des Hypothalamus-Hypophysen-Systems oder der Mikrozirkulation der Schleimhaut des Verdauungstraktes, effektiv werden. Weiterhin kann Somatostatin in einer als parakrin bezeichneten Weise agieren, indem es in den Interzellularraum abgegeben wird und unmittelbar benachbarte Zellen beeinflußt, so z.B. die A- und B-Zellen des Inselapparates. Hierdurch soll sowohl die Glukagon- als auch die Insulinsekretion gehemmt werden (Arimura 1981). Folgerichtig liegen die D-Zellen im endokrinen Pankreas in enger Nachbarschaft von A- und B-Zellen und erreichen diese mit Hilfe von kurzen und dicken Fortsätzen.

4.7 Funktion der PP-Zellen

Die PP-Zellen liegen ebenfalls in der Inselperipherie der im duodenumnahen Pankreasteil vorkommenden Inseln. Es sind kleine, ovale Zellen mit langen Zellfortsätzen, über die sie zu anderen Inselzellen sowie zu Kapillaren in Kontakt treten (Rahier und Wallon 1980).

Die genaue Funktion des pankreatischen Polypeptids ist noch nicht endgültig geklärt. Möglicherweise spielt es eine Rolle in der parakrinen Regulation, da pankreatisches Polypeptid und Somatostatin sich gegenseitig hemmen (Arimura et al. 1979). Darüberhinaus hat es sicherlich

eine regulatorische Wirkung auf die Verdauungsvorgänge (Schwartz et al. 1978).

4.8 Regulation und Freisetzung der Inselhormone

Die oben beschriebene topographische Anordnung der Zellen in den Pankreasinseln bildet die morphologische Grundlage für die genau aufeinander abgestimmte und den Stoffwechselanforderungen angepaßte Freisetzung der Inselhormone. Eine besondere Funktion dürfte dem Übergangsbereich zwischen Zellen der Inselperipherie und den Parenchymzellen des exokrinen Teils der Bauchspeicheldrüse zukommen, da dort afferente Kapillaren und Nerven in die Insel eintreten. Dieser periphere, heterozelluläre Bereich fungiert vermutlich als Vermittler zwischen dem Äußeren und dem Inneren der Insel (Unger et al. 1978). Die verschiedenen Inselzelltypen beeinflussen sich auch gegenseitig, und zwar sowohl auf endokrinem Weg über die Blutbahn als auch durch direkte Kontakte untereinander. Die Kommunikation der Inselzellen untereinander erfolgt direkt mittels "gap-junctions" wie auch über den Interzellularraum (endokrine und/oder parakrine Regulationsmechanismen). Die "gap-junctions" entsprechen Kontaktstellen von niedrigem Widerstand zwischen den Zellen, "electrical coupling", durch die kleine Moleküle (unter 1000 Dalton) von einer Zelle direkt zur anderen treten können, "metabolic coupling" (Orci et al. 1973, 1984). Studien an Inselzellkulturen ergaben, daß ein Molekülaustausch nicht zwischen allen benachbarten Zellen stattfindet. Vielmehr scheint es sich bei den Zellkulturen um eine Anhäufung von voneinander unabhängigen Mikrokolonien zu handeln (Orci 1984). Änderungen in der Zahl jeweils vorhandener "gap-junctions" spielen vermutlich eine Rolle bei der Regelung der Hormonfreisetzung.

Als weitere Membranspezialisierung finden sich an den Inselzellen "tight-junctions". Die "tight junctions" (Fusionszonen der Membranaußenschichten zweier aneinandergrenzender Zellen) stellen eine Diffusionsbarriere dar. Durch die Möglichkeit einer ständigen Neu- wie Rückbildung bewirken sie eine stets wechselnde Kompartimentierung der Inseln und damit der von den Hormonen und Stoffwechselprodukten erreichbaren Inselzellen.

Die Pankreashormone Insulin, Glukagon und Somatostatin werden stets in einem den Stoffwechselanforderungen genau angepaßten Verhältnis freigesetzt. Bei ihrer gegenseitigen Regulierung hemmt Insulin die Glukagon- und möglicherweise auch die Somatostatinfreisetzung, Glukagon stimuliert sowohl die Insulin- als auch die Somatostatinsekretion, während Somatostatin die Sekretion der beiden übrigen Hormone hemmt (Unger et al.1978). Hierbei erfolgt die Hemmung der Insulinfreisetzung durch das endogene Somatostatin möglicherweise nicht nur direkt, sondern auch indirekt durch die Hemmung der Glukagonfreisetzung (Taniguchi et al. 1980). Darüber hinaus wird wahrscheinlich die Insulinfreisetzung entsprechend einem negativen Feed-back durch das Insulin selbst geregelt (Akhtar et al. 1977; Ratzmann und Schulz 1985), wobei für das Ausmaß der insulinbedingten Hemmung der Insulinsekretion u.a. die Glukosekonzentration im Serum ausschlaggebend ist (Verspohl et al. 1982). Eine schematische Darstellung der endokrinen und/oder parakrinen Regulation der Hormonfreisetzung im Inselorgan zeigt die Abbildung 19.

4.9 Der experimentelle Diabetes mellitus

Zur Erzeugung eines Diabetes mellitus kann man erfolgreich sowohl im Organismus physiologischerweise vorkommende als auch organismusfremde Substanzen verwenden. Die diabetogene Wirkung des Harnstoffderivats Alloxan sowie des Glucosaminderivats Streptozotozin ist seit langem bekannt. Beide Substanzen führen zu einer selektiven Zerstörung der B-Zellen. Diesen Stoffen, die eine selektive B-Zellnekrose hervorrufen, stehen jene gegenüber, die ohne Inselzelluntergang zu erheblichen funktionellen und morphologischen Veränderungen am Inselorgan, verbunden mit der Entwicklung einer diabetischen Stoffwechsellage, führen. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind natürliche und synthetische Glucocorticoide.

Glucocorticoide sind nicht nur an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt, sondern beeinflussen auch den Fett- und Eiweißstoffwechsel. Sie fördern die Glukoneogenese aus Aminosäuren. Der Glukoseumsatz wird gesteigert, die Glukosetoleranz und Insulinempfindlichkeit herabgesetzt. Weiterhin wirken die Glucocorticoide katabol, d.h. sie fördern den Proteinabbau und führen so zu einer negativen Stickstoffbilanz. Die katabole Wirkung zeigt sich vor allem an der Muskulatur, der

Haut und dem Skelett. Den Fettstoffwechsel beeinflussen Glucocorticoide, indem sie die lipolytische Wirkung anderer Hormone fördern. Die mineralocorticoide Wirkung der natürlichen sowie einiger synthetischer Glucocorticoide zeigt sich in Natriumretention sowie verstärkter Kaliumausscheidung. Eine Zusammenfassung der Glucocorticoidwirkung findet sich bei Baxter und Forsham (1972).

Ihre therapeutische Anwendung verdanken die Glucocorticoide ihrer antiinflammatorischen, immunsuppressiven und antiallergischen Wirkung. Diese ist allerdings neben dem diabetogenen Effekt von zahlreichen weiteren unerwünschten Nebenwirkungen begleitet, wie Osteoporose, Myopathien, Wachstumshemmungen sowei Ausbildung von Steroidulcera. Diese Nebenwirkungen werden insbesondere durch die katabole Wirkung der Steroide im Stoffwechsel hervorgerufen.

Das Ausmaß der therapeutisch erwünschten Glucocorticoidwirkungen wie der Nebenwirkungen wird durch folgende Faktoren bestimmt: Dosierung (im engeren Sinne Beachtung der Cushingschwellendosis, der Äquivalenzdosis sowie der Halbwertszeit des applizierten Glucocorticoids), Behandlungsdauer und spezielle Eigenschaften des verwendeten Glucocorticoids.

Triamcinolon wird den mittelstark wirksamen, fluorierten Glucocorticoiden zugerechnet. Als Kristallsuspension entspricht es einem Depot-Präparat mit verlängerter Halbwertszeit im Vergleich zum Triamcinolon in molekulardisperser Lösung.

Im Tierexperiment kann die Applikation von Glucocorticoiden in Abhängigkeit von der Dosis und der Art des verwendeten Präparates zum Tod der Versuchstiere führen, wobei nicht die diabetische Stoffwechsellage, sondern eine allgemeine Sepsis (Abszesse in Lunge, Leber und Niere), vermutlich durch die immunsuppressive Wirkung der Steroide bedingt, den Tod der Tiere verursachen (Tonelli 1966). Im vorliegenden Experiment zeigte eines der Versuchstiere der Gruppe VII eine verminderte Erholungsbereitschaft, die sich im Sistieren des Körpergewichts 18% unter dem Ausgangsgewicht bis zum 14. Versuchstag äußerte. Bei diesem Tier konnten makroskopisch Lungenabszesse festgestellt werden.

Das Auftreten des Diabetes mellitus bzw. die Verschlechterung einer bestehenden diabetischen Stoffwechsellage unter Glucocorticoidapplikation beruht in erster Linie auf ihrer glukoneogenetischen Wirkung sowie auf der Verschlechterung des Glukosemetabolismus auf zellulärer Ebene. Weiterhin ist bekannt, daß sich unter Glucocorticoidapplikation das periphere Gewebe sowohl endogenem als auch exogen zugeführtem Insulin gegenüber als resistent erweist. Folglich persistiert die Hyperglykämie auch bei erhöhten Insulinspiegeln, es stellt sich ein sog. Hyperinsulinismus ein (Tomita et al.1984). Dies wurde durch die vorliegende Untersuchung ebenfalls bestätigt. Der Mechanismus der Insulinresistenz unter Glucocorticoiden (beobachtet auch unter Überschuß an Wachstumshormon, Fettleibigkeit sowie weiteren seltenen Krankheitszuständen) war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es hat sich gezeigt, daß Glucocorticoide die Rezeptoraffinität für Insulin an den peripheren Geweben herabsetzen (Kahn et al. 1978), bei chronischer Glucocorticoidapplikation sich die Insulinbindung allerdings normalisiert (Olefsky 1975), der Glukosespiegel also trotz fortgesetzter Steroidapplikation zu normalen Werten zurückkehrt.

Es ist mehrfach berichtet worden, daß eine chronische Glucocorticoidapplikation zur Erhöhung des Plasmainsulinspiegels führt (Campbell 1966; Lenzen 1976, Perley 1966). Dies geht auch aus der vorliegenden Untersuchung hervor, denn die Applikation von Triamcinolon in Kristallsuspension entspricht im Prinzip einer chronischen Glucocorticoidapplikation. Allerdings gibt es eine Reihe neuerer Untersuchungen, wonach Corticosteron in vitro die Insulinsekretion aus den B-Zellen hemmt (Ghiea et al. 1974; Barseghian und Levine 1980; Barseghian et al. 1984), indem es offenbar die stimulierende Wirkung zahlreicher Sekretagoga wie Glukose, Arginin, Carbamylcholin, Leucin oder Calcium abschwächt. Bei höherer Glukosekonzentration in der Perfusionslösung wird allerdings die Sekretagoga hemmende Corticosteronwirkung stark herabgesetzt (Barseghian et al. 1984).

Der Mechanismus der Hemmung der Insulinsekretion durch Corticosteron (und vermutlich auch anderer Glucocorticoide) ist nur teilweise geklärt. Steroidrezeptoren an Pankreasinseln (Green et al. 1978, Tesone et al. 1979) sowie an Pankreashomogenisaten (Svec und Rudis 1981) sind be-

schrieben worden, so daß die Bindung von Corticosteron an seinen Rezeptor der erste Schritt der Corticosteronwirkung sein könnte. Möglicherweise hemmt nachfolgend Corticosteron die Calciumaufnahme in die Zelle und/oder die intrazelluläre Ca-Freisetzung aus den Zellorganellen oder Granula (vgl. Barseghian et al. 1984, Billandel et al. 1984). Die intrazelluläre Konzentration an freien Calciumionen triggert wiederum die Insulinfreisetzung (Mallaisse et al. 1979, Mallaisse-Lagae 1971).
Wie Mallaisse et al.(1979) zeigten, führen höhere Glukosekonzentrationen zur Akkumulation freier Ca-Ionen in den B-Zellen und dadurch zur Freisetzung von Insulin. Es ist nun wahrscheinlich, daß der bei chronischer Steroidapplikation beobachtete Hyperinsulinismus sowie die (weiter unten zu besprechenden) morphologischen Veränderungen an den Pankreasinseln sekundär durch die metabolische Wirkung der Steroide bedingt sind. Der durch Steroide hervorgerufene erhöhte Glukosespiegel könnte zu einer verstärkten Ca-Mobilisierung in den B-Zellen führen und dadurch den inhibitorischen Corticosteroneffekt auf die Insulinfreisetzung übertreffen.

4.10 Morphologische und immuncytochemische Veränderungen an den Pankreasinseln der diabetischen Ratten

Die Zunahme des Inselgewebes auf das zweieinhalbfache des Ausgangswertes stellt einen besonders auffallenden Befund dar. Bereits 1953 haben Hausberger und Ramsey bei Meerschweinchen eine außergewöhnliche, durch Cortison induzierte Hypertrophie der Pankreasinseln sowei eine zahlenmäßige Zunahme und Hyperplasie der B-Zellen beschrieben. Eine Hypertrophie der Pankreasinseln und B-Zellenhyperplasie wurde nach Glucocorticoidapplikation auch bei anderen Spezies beobachtet, wie z.B. bei der Ratte (Yoshinaga et al. 1967), beim Kaninchen (Lazarus und Volk 1959) und beim Affen (Like und Chick 1974). Die Inselhypertrophie ist weitgehend durch erhöhte mitotische B-Zell-Aktivität bedingt und mit erhöhter Insulinsynthese und Insulinabgaberate verbunden (Like und Chick 1974). Aus den in vitro-Untersuchungen von Chick (1973), an Pankreaszellkulturen durchgeführt, geht hervor, daß von den aus in vivo-Untersuchungen bekannten B-Zell-Stimulantien (Glukose, Tolbutamid, Dexamethason, Wachstumshormon und Glukagon) in vitro lediglich die ersten beiden die Mitoserate der B-Zellen und die Insulinfreisetzung steigern. Dexamethason erniedrigte die Insulinfreisetzung, die übrigen Testsubstanzen zeigten

keinen Effekt. Es dürften folglich die persistierende Hyperglykämie bzw. die verminderte Rezeptoraffinität des Insulins an seinen Zielorganen sein, die durch fortwährende Stimulierung der Insulinsynthese und -sekretion schließlich die beschriebenen morphologischen Veränderungen zur Folge haben. Diese äußern sich, wie oben bereits erwähnt, in Hyperplasie der B-Zellen und Hypertrophie des Inselorgans, auf ultrastruktureller Ebene in Hyperplasie des Golgi-Apparates und in Zunahme des rauhen endoplasmatischen Retikulums (Kern und Logothetopoulos 1970, Like und Chick 1974, Orci 1976, Tomita 1984). Neben der Zellhyperplasie konnten in der vorliegenden Studie auch Formveränderungen der B-Zellen nachgewiesen werden, wobei insbesondere die häufig feststellbare Ausbildung von plumpen Zellfortsätzen auffallend ist. Mit Hilfe dieser Zellfortsätze erreichen auch die vom Gefäßsystem entfernt gelegenen Zellen die Kapillaren. In der vorliegenden Untersuchung wurde lichtmikroskopisch keine Veränderung der Inselkapillarisierung beobachtet. Nach Applikation einer höheren Triamcinolondosis als in der vorliegenden Untersuchung verwendet, konnte hingegen eine veränderte Kapillarisierung beobachtet werden (Graf 1982). Diese bestand in einer verstärkten Schlängelung und/oder Vermehrung der Kapillaren.

Die auffallende Zunahme kleinster B-Zellansammlungen steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hausberger und Ramsay(1953) und ist wohl morphologischer Ausdruck für die Neubildung von B-Zellen.

Die immuncytochemischen Untersuchungen zeigen, daß bereits 24 Stunden nach Triamcinolonapplikation eine Degranulierung der B-Zellen zu beobachten ist, verbunden mit einer ebenfalls ab dem ersten Tag p.i. feststellbaren Erhöhung des Plasmainsulinspiegels. Die B-Zelldegranulierung erfaßt zunächst die größeren und erst nach einiger Zeit die kleineren Inseln, wobei sich innerhalb der großen Inseln neben degranulierten stets auch (wenn auch mit zunehmender Versuchsdauer immer weniger) granulierte B-Zellen finden. Dieses Verhalten der B-Zellen könnte Ausdruck einer zunächst nur teilweisen, mit Fortbestehen der entgleisten Stoffwechselsituation jedoch zunehmenden Einbeziehung der B-Zellen in die Regulation der Insulinausschüttung sein. So führte z.B. die Stimulierung der Insulinfreisetzung an Inselzellkulturen zu einer Zunahme der "gap-junctions," verbunden mit einem verstärkten Molekülaustausch durch diese Nexus (Orci 1984). Die Normalisierung der Stoffwechsellage ab dem siebten Tag äußert

sich morphologisch in einer Regranulierung der B-Zellen. Offenbar hält die verstärkte Insulinsyntheserate über die Normalisierung des Glukosespiegels hinaus an, was zu einer verstärkten Insulinspeicherung in den B-Zellen führt. Nur so ist die stärkere Reaktionsintensität der B-Zellen der diabetischen Tiere ab dem siebten Tag im Vergleich zu den Kontrolltieren erklärbar. Die B-Zellen-Regranulierung ist gleichzeitig ein morphologischer Ausdruck für die funktionelle Integrität aller (auch der neuentstandenen) B-Zellen.

Es ist bekannt, daß einzelne Inseln unterschiedliche Insulingehalte aufweisen, wobei offenbar die Lage der Inseln innerhalb des Pankreas mit ein determinierender Faktor für dieses Verhalten ist (Steinke et al. 1972). Beim Vergleich der duodenum- und der milznahen Inseln ein und desselben Tieres konnte in der vorliegenden Untersuchung kein Unterschied der Reaktionsintensität der B-Zellen beobachtet werden. Hierfür ist wohl die angewendete im wesentlichen nur qualitative immunhistochemische Methode verantwortlich zu machen.

Tomita et al.(1984) beobachteten hingegen beim Hamster nach zweimaliger wöchentlicher Gabe von Cortisonacetat und täglicher Applikation von Chlorothiazid ab der sechsten Versuchswoche eine zunehmende Zellnekrose der zentralen Inselareale, wobei die Inselorganmasse insgesamt etwa auf das Doppelte angestiegen war. Eine ungenügende Blutversorgung und/oder eine Erschöpfung der B-Zellen als Ergebnis einer andauernden Hypersekretion könnte die Ursache der B-Zellnekrose beim Hamster sein. Als Fortführung der vorliegenden Untersuchung wäre es interessant festzustellen, ob sich bei der Ratte mit verlängerter Versuchsdauer auch die Form und Anordnung der B-Zellen innerhalb der Inseln bei einer zweieinhalbfachen Zunahme des Inselorgans normalisiert, und ob die durch Zellzunahme zusätzlich gewonnene Insulinsekretionskapazität im Vergleich zu den Kontrolltieren zeitlich limitiert oder über einen längeren Zeitraum bestehen bleibt.

Die Auflockerung des A-Zellmantels ist im Sinne einer relativen Abnahme der A-Zellen zu deuten, bedingt durch die zahlenmäßige Zunahme der B-Zellen und die hieraus resultierende Inselhypertrophie.Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Tomita et al.(1984). Sie beobachteten

während eines Cortison-induzierten Diabetes beim Hamster eine relative Abnahme des Pankreasglukagons. Neben der relativen A-Zellenabnahme dürfte hierfür zusätzlich die Hemmung der Glukagonsynthese durch Insulin verantwortlich sein. In der vorliegenden Untersuchung reicht die Dauer des Hyperinsulinismus offenbar nicht aus, um eine immunzytochemisch faßbare Glukagonabnahme in den A-Zellen hervorzurufen. Tatsächlich berichten auch Tomita et al. nicht über eine veränderte Reaktionsintensität der A-Zellen, und die Abnahme des Pankreasglukagons erreicht erst im Verlauf der dritten Versuchswoche nennenswerte Ausmaße. Im Gegensatz zu den Befunden von Tomita et al. (1984) konnte in der vorliegenden Untersuchung keine Abnahme der PP-Zellen festgestellt werden.

4.11 Glykogen im Inselorgan bei Diabetes mellitus

Obwohl Glykogen ein regulärer Bestandteil des Inselorgans von Säugern ist, wie aus mikrochemischen Messungen hervorgeht (Idahl und Hellmann 1968, Matschinsky und Ellerman 1968, Hellman und Idahl 1969) läßt es sich histochemisch nicht nachweisen. Erst bei Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage kommt es zu vermehrten Glykogenablagerungen im Inselorgan, wodurch es histochemisch darstellbar wird. Seit Toreson (1951) in den sog. "hydropischen" B-Zellen Glykogenablagerungen nachweisen konnte, wurden diese wiederholt zum Untersuchungsgegenstand. Glykogeneinlagerung in B-Zellen bei hyperglykämischen Zuständen konnte bei zahlreichen Tierspezies sowie beim Menschen nachgewiesen werden (Lazarus und Volk 1958, Fagundes und Cohen 1966, Lacy, 1961, Kern und Logothetopoulos 1970, Graf und Klessen 1980). In den B-Zellen des Inselorgans konnten Enzyme der Glykogensynthese wie auch glykogenolytisch wirksame Enzyme nachgewiesen werden (Fagundes und Cohen 1966). Die Glykogenablagerungen könnten somit das Ergebnis einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Glykogensynthese sein, bedingt möglicherweise durch das höhere Glukoseangebot in den B-Zellen, in die Glukose per diffusionem gelangt, verbunden mit einer insulinbedingten, verstärkten Aktivierung der Glykogensynthetase (Eggstein 1972). Die insulinbedingte Aktivitätszunahme der Glykogensynthetase könnte auch die Beobachtung (Graf und Klessen 1980) erklären, wonach sich Glykogenablagerungen vorwiegend in nicht degranulierten B-Zellen fanden.

Die Glykogenablagerung in den B-Zellen ist progressiv mit zunehmendem Schweregrad sowie zunehmender Dauer des Diabetes. Hierbei ist eine zeitliche Verzögerung zwischen Auftreten der Hyperglykämie und histochemisch nachweisbaren Glykogenablagerungen im Inselorgan zu beobachten, wie aus Untersuchungen an verschiedenen Spezies hervorgeht (Ratte, Kaninchen, Hund) (Lazarus und Bencosme 1955, Volk und Lazarus 1958, Lazarus und Volk 1959, Volk und Lazarus 1963, Graf und Klessen 1980). In der vorliegenden Untersuchung konnten geringste Glykogeneinlagerungen in einzelnen Inseln bereits am zweiten Tag, stärkere Glykogeninfiltrationen der B-Zellen zwischen dem dritten und dem fünften Tag nachgewiesen werden, was mit den Befunden von Graf und Klessen (1980) in Übereinstimmung steht. Kern und Logothetopoulos (1970) konnten hingegen beim Meerschweinchen nach täglicher Prednisolonapplikation Glykogen elektronenoptisch erst dreißig Tage p.i. nachweisen. Diese abweichenden Befunde könnten sowohl durch Speziesunterschiede als auch durch die Dauer und Art des verwendeten diabetogenen Agens bedingt sein. Darüberhinaus spielt sicherlich auch die Empfindlichkeit der angewandten Nachweismethode eine Rolle. Ob die Glykogenablagerungen die funktionelle Integrität der B-Zellen temporär oder dauerhaft stören, läßt sich mit den in der vorliegenden Untersuchung angewandten Methoden nicht ermitteln. Morphologisch fanden sich jedoch keine Hinweise auf Zelldegeneration oder -nekrose, und nach Rückgang der Hyperglykämie, verbunden mit dem Verschwinden der Glykogendepots im Inselapparat, kam es zur Regranulierung aller B-Zellen. Auch in elektronenoptischen Untersuchungen konnten weder Degeneration noch Desorganisation der B-Zellorganellen von glykogeninfiltrierten Zellen festgestellt werden (Kern und Logothetopoulos 1970).

4.12 Basophiles Material in den B-Zellen des Inselorgans

Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie hervorgeht, führt die Eisenbindungsreaktion (EBR) - insbesondere nach Vorbehandlung der Schnitte mit äthanolischer KOH zur Darstellung verschiedenartiger EBR-positiver d.h. primär basophiler bzw. kationophiler (s.u.) Strukturen im Inselorgan. Im Einzelnen sind dies: nahe dem Zellkern gelegene halbmond- bis kappenförmige Areale in den B-Zellen, wobei es sich um das Golgi-Feld handeln dürfte; des weiteren wird eine feine homogen-diffus verteilte Komponente in den Inselzellen dargestellt. Schließlich führt die Eisenbindungsreaktion zu einer scharflinigen Konturierung der Zellgrenzen.

Außerdem bewirkt sie eine Anfärbung des perikapillären Bindegewebes. Ein auffallender Unterschied zwischen Kontrolltieren und diabetischen Tieren besteht darin, daß bei letzteren die Anfärbung der kernnahen Bereiche der B-Zellen und der Zellmembran stärker ausgeprägt ist, die zytoplasmatische Komponente sich dagegen vermindert oder in zahlreichen B-Zellen überhaupt nicht darstellt. Diese EBR-positive Basophilie ist nach längerdauernder Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit Neuraminidase nicht mehr nachweisbar. Hieraus folgt, daß der positive Ausfall der Eisenbindungsreaktion im wesentlichen auf das Vorliegen von Sialinsäureresten beispielsweise in Sialoglykoproteinen zu beziehen ist.

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Eisenbindungsreaktion ist in verschiedenen Modifikationen schon mehrfach sowohl in licht- als auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zum histochemischem Nachweis von Sialinsäure verwendet worden (Gasic und Gasic 1962, Gasic und Berwick 1963, Benedetti und Emmelot 1967, Gasic et al. 1968, Halbhuber und Halbhuber 1970, Haemmerli et al. 1972, Klessen 1973). Die Reaktion beruht im Prinzip auf der elektrostatischen Bindung positiv geladener kolloidaler Eisenteilchen an die negativ geladenen Karboxylgruppen der Sialinsäure. Das gebundene Eisen wird anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt mit der Berliner Blau Reaktion nachgewiesen. Ein besonderer Vorteil der Eisenbindungsreaktion gegenüber basischen Farbstoffen besteht in ihrer hohen Empfindlichkeit (Mowry 1963, Arnold 1972). Die Spezifitätskontrolle erfolgt durch Behandlung von Kontrollschnitten mit hochgereinigter Neuraminidase. Auffallend ist, daß nach milder Alkalibehandlung des Gewebsschnittes es zu einer erheblichen Intensivierung der neuraminidase-sensiblen Eisenbindungsreaktion im vermuteten Golgi-Feld der B-Zellen bei den diabetischen Tieren kam. Worauf diese Intensivierung im Einzelnen beruht ist unklar. Möglicherweise liegt ein Teil der Sialinsäurekarboxylgruppen als Ester oder Säureamid vor, deren Hydrolyse zur Freisetzung stark saurer Sialinsäurereste führt (Lev und Spicer 1965; Mäkela et al. 1971).

Um welche funktionelle Strukturen es sich bei den sialinsäurehaltigen Komponenten im Inselorgan im Einzelnen handelt, läßt sich aus den vorliegenden Befunden naturgemäß nicht ableiten. Sialinsäure ist integraler Bestandteil zahlreicher biologisch aktiver Glykoproteine (Membranen, Hormone, Enzyme, Sekrete), deren Funktion unter Umständen sehr entscheidend von der Sialinsäurekomponente mitbestimmt wird (u.a. Winzler 1972; Faillard und Schauer 1972; Jeanloz und Codington 1976; Glick und Flowers 1978; Montreuil 1980). Entsprechend ist die jeweilige spezifische Funktion nach enzymatischer Abspaltung der Sialinsäure mit Neuraminidase verändert, eingeschränkt oder geht vollständig verloren. Bei der kernnahen Komponente könnte es sich möglicherweise um ein das Golgi-Feld markierendes, als Enzym wirkendes Sialoglykoprotein handeln; die erhebliche Verstärkung dieser Komponente bei steroid-diabetischen Ratten könnte hierfür - im Sinne einer Enzyminduktion - jedenfalls ein Hinweis sein.

Der zytoplasmatischen EBR-positiven Basophilie liegen vermutlich verschiedenartige Strukturen resp. Stoffe zugrunde. Auffallend ist, daß das Basophilieausmaß sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den diabetischen Tieren mit der Intensität des immunzytochemischen Insulinnachweises im Zytoplasma der B-Zellen korrespondiert, d.h. je intensiver der mit der PAP-Technik durchgeführte Insulinnachweis in den B-Zellen ausfällt, desto stärker erweist sich auch die EBR-positive zytoplasmatische Basophilie und umgekehrt läßt sich im Zytoplasma der degranulierten B-Zellen der diabetischen Tiere auch kein EBR-positives Material nachweisen. Da die EBR-positive zytoplasmatische Basophilie durch Inkubation der Schnitte mit Neuraminidase eliminierbar ist, dürfte es sich hierbei ebenfalls um als Strukturkomponenten und/oder als Enzyme funktionierende membrangebundene Sialoglykokonjugate handeln, gebunden beispielsweise an die Membran der beta-Granula. Daß im Inselorgan, insbesondere in den B-Zellen, tatsächlich Sialoglykokonjugate vorkommen, ist in neueren Untersuchungen unter Verwendung eines für Sialinsäure spezifischen Lektins nachgewiesen worden (Schulte et al.1984).

Ein Teil der zytoplasmatischen Basophilie könnte außerdem auf Ribonukleotide zu beziehen sein. Klessen (1978) konnte die zytoplasmatische Basophilie erst nach zusätzlicher Vorbehandlung der Schnitte mit Ribonuklease (nach erfolgter Vorinkubation mit Neuraminidase) gänzlich eliminieren. Dennoch widersprechen seine Ergebnisse jenen der vorliegenden Untersuchung nicht. Tatsächlich enthalten die Inselzellen, wie aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht, nur ein sehr spärlich entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum, so daß lichtmikroskopisch von vornherein nicht mit einer stärkeren, auf RNS zu beziehenden Basophilie zu rechnen ist. Darüberhinaus erweist sich die auf Ribonukleotide zu beziehende Basophilie sowohl gegenüber saurer als auch alkalischer Hydrolyse als sehr sensibel (Klessen 1984, pers.Mitt.). Sie kann folglich in der vorliegenden Untersuchung durch die Alkalivorbehandlung verloren gegangen sein.

Einen Hinweis darauf, daß mit einer durch RNS bedingten Bsaophilie im Zytoplasma der B-Zellen zu rechnen ist, ergibt sich aus der Anwendung der für Ribonukleinsäure spezifischen Gallocyanin-Chromalaun Färbung. Die zytoplasmatische RNS-Darstellung ist zwar sehr schwach, aber durch Vorbehandlung der Schnitte mit Ribonuklease ersichtlich eliminierbar. Die verstärkte Reaktionsintensität der peripheren Zytoplasmabereiche der diabetischen Tiere der Gruppen I-IV könnte somit als Ausdruck einer erhöhten Syntheseaktivität der B-Zellen gedeutet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit immuncytochemischen und histochemischen Methoden wurden am Inselorgan des Rattenpankreas Veränderungen untersucht, die nach Applikation eines fluorierten synthetischen Glucokorticoids (Triamcinolon A-Kristallsuspension; TA-KS) entstehen. Innerhalb von 24 Stunden nach TA-KS-Applikation entwickelten alle Versuchstiere eine Hyperglykämie sowie einen Hyperinsulinismus, die beide bis zum 5.Tag an Ausmaß zunahmen. Ab dem 7.Tag normalisierte sich sowohl der Blutzucker als auch der Insulinspiegel der Versuchstiere. Parallel zum Anstieg des Glukosespiegels verloren die Versuchstiere bis zum 5. Tag an Gewicht und zwar bis zu 20% des Ausgangswertes. Danach nahmen sie wieder an Gewicht zu und erreichten bis zum Versuchsende annähernd ihr Ausgangsgewicht.

Histologisch ließ sich eine Hypertrophie der B-Zellen und eine Hyperplasie des Inselorgans nachweisen. Bedingt durch eine erhöhte Mitoseaktivität der B-Zellen stieg der Inselparenchymteil am Gesamtpankreas bis zum Versuchsende auf das 2,5fache des Ausgangswertes an.

Mit immuncytochemischer Technik konnte bereits 24 Stunden nach Applikation von TA-KS eine Degranulierung der B-Zellen resp. eine Insulinfreisetzung nachgewiesen werden. Diese erfaßte zunächst die größeren, mit zunehmender Versuchsdauer auch die kleineren Inseln. Ab dem 7.Tag regranulierten die B-Zellen der Versuchstiere, ihre Reaktionsintensität übertraf am Versuchsende jene der Kontrolltiere, d.h. sie enthielten möglicherweise mehr Insulin als die B-Zellen der Kontrolltiere. Der relative Anteil der A-Zellen an den Pankreasinseln nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab, eine Veränderung ihrer Reaktionsintensität etwa im Sinne einer Degranulierung ließ sich nicht feststellen. An D- und PP-Zellen konnten keine Veränderungen nach TA-KS-Applikation festgestellt werden. Zwischen dem 2. und 7.Tag kam es zur vorübergehenden Glykogeninfiltration der Pankreasinseln mit einem Maximum am 5.Tag.

In den B-Zellen der diabetischen Tiere ließ sich mit der Eisenbindungsreaktion (EBR) eine starke Zunahme basophilen Materials in einem kernnahe gelegenen Areal, welches vermutlich dem Golgifeld entspricht, nachweisen. Da sich diese Komponente als neuraminidasesensibel erwies, dürfte

es sich hierbei um Sialoglykokonjugate handeln. Im Gegensatz hierzu zeigte sich, daß eine weiter neuraminidasesensible zytoplasmatische EBR-positive Komponente mit fortschreitender Degranulation der B-Zellen ebenfalls abnahm, um mit einsetzender Regranulation wieder zuzunehmen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Sialoglykokonjugaten um an beta-Granula gebundene Enzyme oder um eine Strukturkomponente dieser insulinhaltigen Granula.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ARIMURA, A., MEYERS, C.A., CASE, W.L., MURPHY, W.A., SCHALLY, A.V.: Suppression of somatostatin levels in the hepatic portal and systemic plasma of the rat by synthetic human pancreatic polypeptide. Biochem. biophys. Res.Commun. 89, 913, 918 (1979).

ARIMURA, A., FISCHBACK, J.B.: Somatostatin: Regulation of Secretion. Neuroendocrinology 33, 246-256 (1981).

ARIMURA, A.: Recent Progress in Somatostatin. Research Biomedical Research 2, 233-257 (1981).

ARNOLD, M.: Histochemie - Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York pp.70, 117 (1968)

ARNOLD, M.: Die Verwendbarkeit von Metallsolen zum elektronenmikroskopischen Nachweis von sauren Mukopolysacchariden. Acta histochem.(Jena) Suppl.X, 149-163 (1972).

BANTING, F.G., BEST, C.M.: The internal secretion of the pancreas. J.Lab. clin.Med.7, 251-266 (1922).

BARSEGHIAN, G., LEVINE, R.: Effect of corticosterone on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas. Endocrinology 106, 547-552 (1980).

BARSEGHIAN, G., TOMKINSON, C., HWANG, D.L., LEV-RAN, A.: Effect of Corticosterone on Carbamylcholin-, Leucine-, or Calcium- induced Insulin Secretion by the Isolated Perfused Rat Pancreas. Endocrinology 114, 1086-1089 (1984).

BAXTER, J.D., FORSHAM, P.H.: Tissue Effects of Glucocorticoids. Amer.J. Med.53, 573-589 (1972).

BENEDETTI, E.L., EMMELOT, P.: Studies on plasma membranes. IV. The ultrastructural localization and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver and hepatoma. J.Cell.Sci.2, 499-512 (1967).

BILLANDEL, B., MATHIAS, P.C.F., SUTTER, B.C.J., MALAISSE, W.J.: Inhibition by corticosterone of calcium inflow and insulin in rat pancreatic islets. J.Endocr. 100, 227-233 (1984).

BLOOM, W.: A new type of granular cell in the islets of Langerhans of man. Anat.Rec.49, 363-371 (1931).

CAMPBELL, J., RASTOGI, K.S., HAUSLER, H.R.: Hyperinsulinemia with diabetes induced by cortisone, and the influence of growth hormone in the chinese Hamster. Endocrinology 79, 749-756 (1966)

CHICK, W.L.: Beta Cell Replication in Rat Pancreatic Monolayer Cultures. Effect of Glucose, Tolbutamide, Glucocorticoid, Growth Hormone and Glucagon. Diabetes 22, 687-693 (1973).

CRIPPA, A.: Sulla utilizzazione del tetracetato di piombo come ossidante in istochimica. Boll.Soc. .Biol.Sper 27, 599 (1951).

CULLING, C.F., REID, P.E., DUNN, W.L.: The effect of saponification upon certain histochemical reactions of the epithelial mucins of the gastrointestinal tract. J.Histochem.Cytochem.19, 654-662 (1971).

CULLING, C.F., REID, P.E., CLAY, M.G., DUNN, L.W.: The histochemical demonstration of O-acylated sialic acid in gastrointestinal mucins. Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect. J.Histochem.Cytochem.22, 826-831 (1974).

EGGSTEIN, M.: Kohlenhydratstoffwechsel. In: Pathophysiologie, Bd.I (Hrsg. :Bock, H.E.), 73-143 (p.98), Georg Thieme Verlag Stuttgart (1972).

FAGUNDES, L.A., COHEN, R.B.: Observations on Amylophosphorylase Activity and Native Glycogen in Islet Cells. Lab.Invest.15, 312-318 (1966).

FAILLARD, H., SCHAUER, R.: Glycoproteins as lubricants, protective agents, carriers, structural proteins and as participants in other functions. in: Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function (A.Gottschalk, ed.) 2nd ed. 1246-1267, Elsevie Publishing Co., Amsterdam (1972).

GASIC, G., GASIC, T.: Removal of sialic acid from the cell coat in tumor cells and vascular endothelium, and its effects on metastasis. Proc. nat. Acad.Sci. U.S.48, 1172-1177 (1962).

GASIC, G., BERWICK, L.: Hale stain for sialic acid- containing mucins. J.Cell Biol.19, 223-228 (1963).

GASIC, G., BERWICK, L., SORRENTINO, M.: Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stains. Lab.Invest.18, 63-71 (1968).

GHIEA, D., COSTINEZ, E., SIMIONESCU, L., OPRESON, M.: The influence of glucocorticoids upon the dynamics of insulin release by perfused rat pancreas. Diabetologia 10, 366 (1974).

GLICK, M.C., FLOWERS, H.: Surface membranes. In: The Glycoconjugates Vol.II (ed.Horowitz, M.I., Pugman, W.) 337- 384.New York, London: Academic Press. (1978).

GOTTSCHALK, A., DRZENIEK, R.: Neuraminidase as a tool in structural analyzis. In: A.Gottschalk, Glykoproteins. Their Composition, Structure and Function. BBA Library, vol 5, part A, sec.ed., pp 381-399. Amsterdam-London-New York Elsevier Publishing Co. (1972).

GRAF, R., KLESSEN, C.: Glycogen in Pancreatic Islets of Steroid Diabetic Rats. Carbohydrate Histochemical Detection and Localization Using an Immunocytochemical Technique. Histochemistry 73, 225-232 (1981).

GRAF, R.: Immuncytochemische und elektronenoptische Untersuchungen zum experimentellen Steroiddiabetes am Inselorgan der Ratte. Dissertation Tübingen, Berlin (1982).

GRAHAM, R.C., KARNOVSKY, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by an new technique. J.Histochem.Cytochem. 14, 291-302 (1966).

GRAUMANN, W.: Erfahrungen mit Bleitetraacetat als Oxydans für 1.2.Glykole. Z.wiss.Mikr.61, 361 (1953).

GRAUMANN, W.: Die histochemische Perjodatreaktion der Retikulin- und Kollagenfasern. Acta Histochem. (Jena) 1, 116-126 (1954).

GRAUMANN, W., CLAUSS, W.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. Acta histochem.(Jena)6, 1-7 (1958).

GRAUMANN, W., CLAUSS, W.: Untersuchungen zum cytochemischen Glykogennachweis. II.Mitt. Versuche zum Diastasetest. Histochemie 1, 241 (1959).

GREEN, I.C., HOWELL, S.L., EL SUFI, S., PERRIN, D.: Binding of ^{3}H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. Diabetologia 15, 349-355 (1978).

HAEMMERLI, G., GENTER L.J., STRÄULI, P.: Zytophotometrische Bestimmungen des Hale-positiven Materials an der Zelloberfläche. Acta histochem. (Jena), Suppl.-Bd.XII, 307-308 (1972).

HALBHUBER, U., HALBHUBER, K.-J.: Vergleichend histochemische Untersuchungen am Sekret der Orbitaldrüsen einiger Säuger und an der Tränendrüse des Menschen. Acta Histochem.(Jena) 37, 268-301 (1970).

HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. Nature (Lond.) 157, 803 (1946).

HAUSBERGER, F.X., RAMSAY, A.J.: Steroid Diabetes in Guinea Pigs. Endocrinology 53, 423-435 (1953).

HELLMAN, B., IDAHL, L.: Presence and mobilisation of glycogen in mammalian pancreatic ß-cells. Endocrinology 84, 1-8 (1969).

IDAHL, L.A., HELLMANN, B.: Microchemical assays of glucose and glucose-6-phosphat in mammalian pancreatic ß-cells. Acta endocr.(Kbh.) 59, 479-486 (1968).

INGLE, D.J.: The production of glucosuria in the normal rat by means of 17-Hydroxy-11-Dehydrocorticosterone. Endocrinology 29,649-652 (1941).

JEANLOZ, K.W., CODINGTON, J.F.: The biological role of sialic acid at the surface of the cell. In: Biological Roles of Sialic Acid (ed. by Rosenberg, A., Schengrund, C.L.) pp.201-238 New York, London: Plenum Press (1976)

KAHN, C.R., GOLDFINE, I.D., NEVILLE, D.M., DE MEYTS, P.: Alterations in Insulin Binding Induced by Changes in vivo in the Levels of Glucocorticoids and Growth Hormone. Endocrinology 103, 1054-1066 (1978).

KERN, H., LOGOTHETOPOULOS, J.: Steroid Diabetes in the Guinea Pig. Studies on Islets-cell Ultrastructure and Regeneration. Diabtetes 19, 145-154 (1970).

KLESSEN, Ch.: Zum Nachweis von Sialinsäure enthaltenden Glykoproteinen in den Mucoidzellen der Adenohypophyse der Ratte. Histochemie 35, 297-306 (1973).

KLESSEN, Ch., REHBEIN, A.: Zur Schnittmontierung mit Chrom-Gelatine und Formol-Gelatine bei Behandlung von Gewebsschnitten mit Perameisensäure. Histochemistry 42, 175-179 (1974).

KLESSEN, Ch.: The Histochemical Demonstration of Sialic Acid Residues in Pancreatic Islets. Histochemistry 57, 251-254 (1978).

KLESSEN Ch.: persönl. Mitteilung 1984

LACY, P.E.: Electron Microscopy of the Beta Cell of the Pancreas. Amer. J.Med.31, 851-859 (1961).

LANGERHANS, P.: Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. Med.Diss., Berlin 1869

LANE, M.A.: The cytological characters of the areas of Langerhans. Amer. J.Anat. 7, 409-422 (1907).

LARSSON, L.I., SUNDLER, F., HÅKANSON, R.: Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) to a population of islet cells. Cell Tiss.Res. 156, 167-171 (1975).

LAZARUS, S.S., BENCOSME, S.A.: Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 89, 114-118 (1955).

LAZARUS, S.S., VOLK, B.W.: Glycogen Infiltration ("Hydropic Degeneration") in the Pancreas. A.M.A.of Pathol. 66, 59-71 (1958).

LAZARUS, S.S., VOLK, B.W.: Pancreatic adaptation to diabetogenic hormons. Arch.Path.Lab.Med. 67, 456-467 (1959).

LENZEN, S.: The effect of hydrocortisone treatment and adrenalectomy on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas. Endocrinology 68, 189-197 (1976).

LEV, R., SPICER, S.S.: A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. Amer.J.Path.46, 23-47 (1965).

LIKE, A.A., CHICK, W.L.: Pancreatic Beta Cell Replication Induced by Glucocorticoids in Subhuman Primates. Amer.J.Path. 75, 329-348 (1974).

LILLIE, R.D., GRECO, J., LASKEY,A.: Histochemical studies with malt diastase: partial separation of the fractions destroying cytoplasmatic basophilia (ribonucleic acid) and the metachromasia of cartilage. Anat.Rec.103, 635 (1949).

MÄKELÄ, V., KORONEN, L.K., LILIUS, G.: Carbohydrate-rich compounds in the colonic mucosa of man. I.Histochemical characteristics of normal and adenomatous colonic mucosa. Cancer 27, 120-127 (1971).

MALAISSE-LAGAE, F., MALAISSE, W.J.: Stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptable of calcium by isolated islets of Langerhans. Endocrinology 88, 72-80 (1971).

MALAISSE, W.J., HUTTON, J.C., KAWAZU, S., HERCHNELZ, A., VALVERDE, J., SENER, A.: The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events. Diabetologia 16, 331-341 (1979).

MALININ, G.J.: Dimethyl-sulfoxide-lead tetraacetate method for histochemical oxidation of polysaccharides. J.Histochem.Cytochem.24, 443 (1976).

MCMANUS, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature (Lond.) 158, 202 (1946).

MATSCHINSKY, F.M., ELLERMAN, J.E.: Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. J.Biol.Chem.243, 2730-2736 (1968).

v.MERING, J., MINKOWSKI, O.: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. Arch.exp.Path.Pharmak.26, 371-387 (1890).

MONTREUIL, J.: Primary structure of glycoprotein glycans: Basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv.Carb.Chem.Biochem.37, 157-223 (1980).

MOWRY, R.W.: The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8gX and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction. Ann.N.Y.Acad.Sci.106, 402-423 (1963).

OLEFSKY., J.M., JOHNSON, J., LIU, F., JEN, P., REAVEN, G.M.: The Effects of Acute and Chronic Dexamethasone Administration on Insulin Binding to Isolated Rat Hepatocytes and Adipocytes. Metabolism 24, 517-527 (1975).

ORCI, L., UNGER, R.H., RENOLD, A.E.: Structural Coupling Between Pancreatic Islet Cells. Experimentia 29, 1015-1018 (1973).

ORCI,L., PERRELET, A., RAVAZZOLA, M., MALAISSE-LAGAE, F., RENOLD, A.E.: A Specialized Membrane Junction between Nerve Endings and B-Cells in Islets of Langerhans. Europ.J.clin.Invest. 3, 443-445 (1973).

ORCI, L.: Review Article. A Portrait of the Pancreatic B-Cell. Diabetologia 10, 163-183 (1974).

ORCI, L.: Some aspects of the morphology of insulin secreting cells. Acta histochem.55, 147-158 (1976).

ORCI, L.: Macro- and Micro- Domains in the Endocrine Pancreas. Diabetes, 31, 538-565 (1982).

ORCI,L.: Cellular Relationships in the islets of Langerhans: A Regulatory Perspective. In: The Importance of Islets of Langerhans for Modern Endocrinology. (Ed.: K.F.Fedulin, J.Scholtholt), Raven Press. New York (1984).

PAPPAS, P.W.: The use of a chromalaun gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffine sections. Stain Technol. 46, 121-124 (1971).

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 3rd.ed.Vol.I London:Churchill 1968.

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, Theoretical and Applied. 3rd.ed.Vol.II London:Churchill 1972.

PERLEY, M., KIPRIS, D.M.: Effect of glucocorticoids on plasma insulin. N.Eng.J.Med.274, 1237-1241 (1966).

RAHIER, J., WALLON, J.: Long Cytoplasmic Processes in Pancreatic Polypeptide Cells. Cell.Tiss.Res.209, 365-370 (1980).

REID, P.E., CULLING, C.F., DUNN, W.L.: Saponification-induced increase in the periodic acid-Schiff reaction in the gastrointestinal tract. Mechanism and distribution of the reactive substance. J.Histochem. Cytochem.21, 473-482 (1973).

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. 16.Aufl. R.Oldenbourg, München-Wien (1968).

SCHULTE, B.A., SPICER, S.S., MILLER, R.L.: Histochemical localization of sialoglycoconjugates with a sialic acid-specific lectin from the slug Limax flavus. Histochem.J. 16, 1125-1132 (1984).

SCHWARTZ, T.W., STENQUIST, B., OLBE, L.: Physiology of mammalian PP and the importance of vagal regulation. In: Gut hormones (ed.Bloom S.R.) pp. 261-267. Churchill Livingstone, Edinburgh (1978).

SORVARI, T.E., STOWARD, P.J.: Saponification of methylated mucosubstances at low temperatures. Stain Technol.46, 49-52 (1972).

SSOBOLEW, I.W.: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Secretion der Bauchspeicheldrüse. (Die Bedeutung der Langerhansschen Inseln) Virchows Arch.path.Anat. 168, 91-128 (1902).

STEINER, D.F., CHAN, S.J., KWOLE, S.C.M., KONRAD, M., PATZELT, C., TAGER, H.S., RUBENSTEIN, A.H.: Formation of Islet Hormones. In: Recent Advances in Obesity and Diabetes (Ed.Melchionda N.et al.), pp.175-189, Raven Press., New York (1984).

STERNBERGER, L.A.: Immunocytochemistry. John Wiley and sons. New York (1979).

SVEC, F., RUDIS, M.: Glucocorticoid Hormone receptions in rat pancreas. Biochim.Biophys.Acta 674, 30-36 (1981).

TANIGUCHI, H., MURABAMI, K., TSUTON, A., TAMAGAWA, M., EJIRI, K., YOSHIOHA, M., UTSUMI, M., MORITA, S., BABA, S.: Role of Glucagon and Somatostatin in Insulin Release. Endocrinol.Japon.1, 103-107 (1980).

TESONE, M., CHAZENBALK, G.D., BALLEJOS, G., CHARREAU, E.H.: Estrogen receptor in rat pancreatic islets. J.Steroid.Biochem. 11, 1309-1314 (1979).

TOMITA, T., VISSER, P.,FRIESEN, S.,DOULL, V.: Cortisone-induced islet cell hyperplasia in hamsters. Virchows Arch.(Cell Pathol.) 45, 85-95, (1984).

TONELLI, G.: Acute toxicity of corticosteroids in the rat. Toxicol appl. Pharmacol. 8, 250-258 (1966).

TORESON, W.E.: Glycogen infiltration (so-called hydropic degeneration) in the pancreas in human and experimental diabetes mellitus. Amer.J. Pathol. 27, 327-347 (1951).

UNGER, R.M., DOBBS, R.E., ORCI, L.: Insulin, Glucagon and Somatostatin Secretion in the Regulation of metabolism. Amer.Rev.Physiol.40, 307-343 (1978).

VALE, W., BRAZEAN, P., RIVIER, C., BROWN, M., BOSS, B., RIVIER, J., BURGUS, R., LING, N., GUILLEMN, R.: Somatostatin. Recent Prog.Horm.Res. 31, 365-397 (1975).

VOLK, B.W., LAZARUS, S.S.: Glycogenization of Canine Pancreatic A Cells During Growth Hormone Diabetes. Endocrinology 72, 496-498 (1963).

WILLIAMS, M.A.: Autoradiography and immunocytochemistry. In: Practical methods in electron microscopy. (Ed.Glauert, A.M.) p.175. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York - Oxford (1977).

WINZLER, R.J.: Glycoproteins of plasma membranes chemistry and function, in: Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function (A.Gottschalk, ed.) 2nd ed., pp.1228-1245, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1972).

YOSHINAGA, T., KATAYAMA, T., NAKAJIMA, I., NISHIKAWA, M.: Einfluß von Glucocorticoiden auf die Langerhansschen Inseln der Ratte. Endokrinologie 51, 211-223 (1967).

Nachtrag:

AKHTAR, M.S., VERSPOHL, E., HEGNER, D., AMMON, H.P.T.: 6-Phosphogluconate/Glucose-6-Phosphate Ratio in Rat Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin release by Exogenous Insulin. Diabetes 26, 857-863 (1977).

RATZMANN, K.P., SCHULZ, B.: Further Support for Inhibition of Endogenous Insulin Secretion by Exogenous Insulin. Exp.Clin.Endocrinol. 85 , 75-80 (1985).

STEINKE, J., PATEL, T.N., AMMON, H.P.T.: Relationship Between Glucose- and Tolbutamide-induced Insulin Release and Insulin Content in Single Pancreatic Rat Islets. Metabolism 21, 465-469 (1972).

VERSPOHL, E., HÄNDEL, M., HAGENLOH, I., AMMON, H.P.T.: In Vitro Effect of Exogenous Insulin on Insulin Secretion. Studies with Glucose, Leucine, Arginine, Aminophylline and Tolbutamide. Acta diabet.lat. 19, 303-317 (1982).

7. ABBILDUNGSLEGENDEN

Abb. 1: Schematische Darstellung der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP-Reaktion nach Sternberger)

Abb. 2: Blutzuckerspiegel: Zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration nach TA-KS-Applikation mit Standardabweichung.

Balken mit grobem Raster: diabetische Tiere
Balken mit feinem Raster: Kontrolltiere
n: Anzahl der berücksichtigten Glukosewerte

Abb. 3: Gewichtsverlauf:

Balken mit grobem Raster: diabetische Tiere, ohne Berücksichtigung des erkrankten Tieres 2 der Gruppe VII
Balken mit feinem Raster: Kontrolltiere
Angegeben ist ferner die Standardabweichung sowie die Anzahl der Versuchstiere am jeweiligen Versuchstag.

Abb. 4: Inselgewebe/Gesamtparenchym des Pankreas.
Gewebsanteil der Inseln am Gesamtparenchym des Pankreas in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Versuchs nach TA-KS-Applikation.

Balken mit grobem Raster: diabetische Tiere
Balken mit feinem Raster: Kontrolltiere
n: Anzahl der Versuchstiere

Abb. 5: Insel, HE-Färbung. 5.Tag post injectionem.-
Zellmitosen im Telophasenstadium (Pfeile)

Abb. 6: Milznaher Inseltyp: A-Zellendarstellung.
Die A-Zellen bilden einen Zellsaum um die B-Zellen (PAP-Methode).

Abb. 7: Duodenumnahe Insel. PP-Zellendarstellung.
In den duodenumnahen Inseln bilden die PP-Zellen einen deutlichen Zellsaum um die B-Zellen (PAP-Methode).

Abb. 8: Duodenumnahe Insel. Insulindarstellung.
Die B-Zellen nehmen den gesamten zentralen Inselanteil ein.
Die peripheren Inselzellen bleiben ungefärbt (PAP-Methode).

Abb. 9: Somatostatin-produzierende D-Zellen.
Sie liegen in der heterozellulären peripheren Zone zwischen den A-bzw. PP-Zellen (PAP-Methode). Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrastverfahren n.Nomarski.

Abb. 10: Insulindarstellung, 1.Tag p.i..
Die B-Zellen zeigen eine deutlich verminderte Reaktionsintensität. Neben ausgeschütteten B-Zellen finden sich stets auch einzelne stark positiv reagierende Zellen (PAP-Methode).

Abb. 11: Milznahe Insel, Insulindarstellung, 5.Tag p.i.
Neben der Degranulierung in größeren Inseln findet sich eine deutliche B-Zellendegranulierung zunehmend auch in den kleineren Inseln (PAP-Methode).

Abb. 12: Milznahe Insel, Insulindarstellung, 14.Tag p.i..
Die B-Zellen der großen und kleinen Inseln sind regranuliert. Die Reaktionsintensität übertrifft jene der Kontrolltiere (vgl.Abb.8) (PAP-Methode).

Abb. 13: "Glukagon-reiche" Insel, Glukagondarstellung, 10. Tag p.i..
Der A-Zellensaum ist deutlich aufgelockert. Die A-Zellen liegen vorwiegend einzeln am Inselrand (PAP-Methode). Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrastverfahren n.Nomarski.

Abb. 14: Glykogendarstellung (Bleitetraacetat-Schiff-Reaktion), 5.Tag p.i..
Die Glykogengranula finden sich in den zentral gelegenen Inselzellen in den Wänden der Inselkapillaren (starke "Glykogenflucht"). Inselkontur mit Tusche nachgezogen.

Abb. 15: Glykogendarstellung (Bleitetraacetat-Schiff-Reaktion) nach Vorbehandlung mit Diastase, 5.Tag p.i..
Der Glykogennachweis fällt durchgehend negativ aus. Inselkontur mit Tusche nachgezogen.

Abb. 16: Milznahe Insel, 4.Tag p.i., Eisenbindungsreaktion (EBR).
Es lassen sich mehrere deutlich basophil reagierende Strukturen darstellen. a) Kreis-bzw. halbmondförmige Strukturen um dem Zellkern, b) die Membran der Inselzellen, c) das Zellzytoplasma (Pfeile).

Abb. 17: Milznahe Insel, 4.Tag p.i., KOH-EBR.
Verstärkung der Basophilie insbesondere der kernnahen Bereiche durch KOH-Vorbehandlung.

Abb. 18: Verteilung der verschiedenen Inselzelltypen.
Im Zentrum der Insel liegen die B-Zellen (weiß),
in der Inselperipherie die A- bzw. PP-Zellen (gepunktet),
dazwischen die D-Zellen (schwarz) (nach Unger et al.1978).

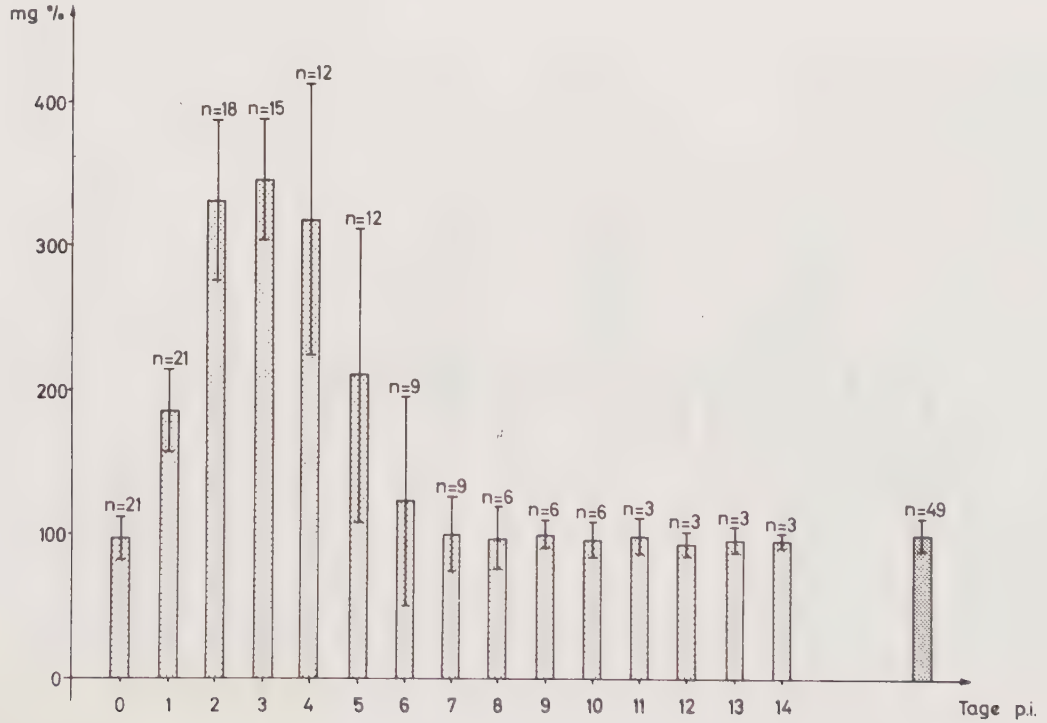
Abb. 19: Parakrine und/oder endokrine Regulation der Hormonfreisetzung:
Somatostatin hemmt die Freisetzung von Glukagon und Insulin,
Insulin hemmt die Freisetzung von Glukagon, Glukagon fördert sowohl die Freisetzung von Insulin als auch von Somatostatin (nach Unger et al. 1978).

Gewebsantigen
Insulin
Kaninchenantiserum
gegen Insulin

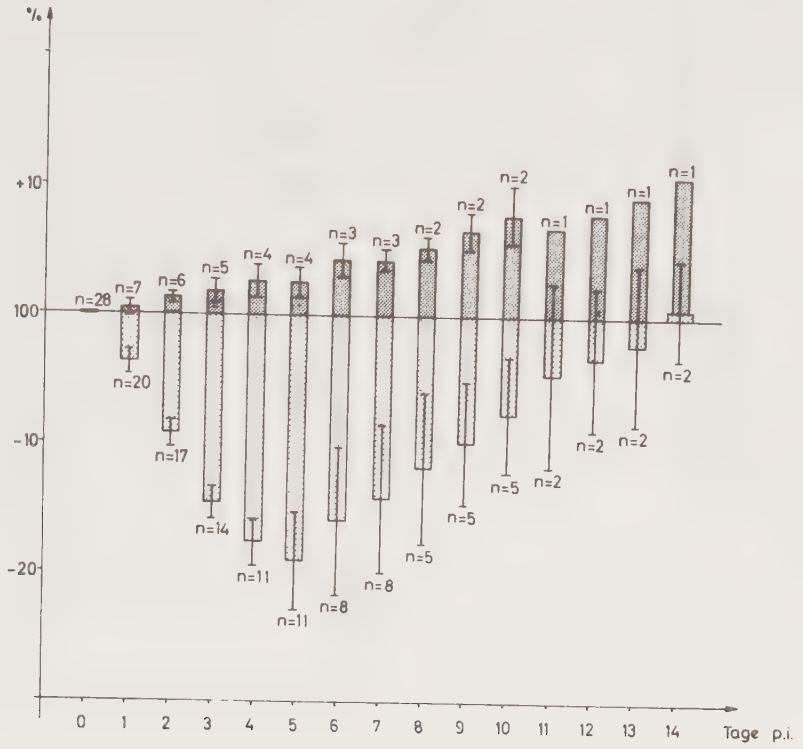
Antikaninchen IgG
vom Schaf
Kaninchen-Peroxidase
Anti-Peroxidase Komplex

Anfärbung mit DAB+H_2O_2

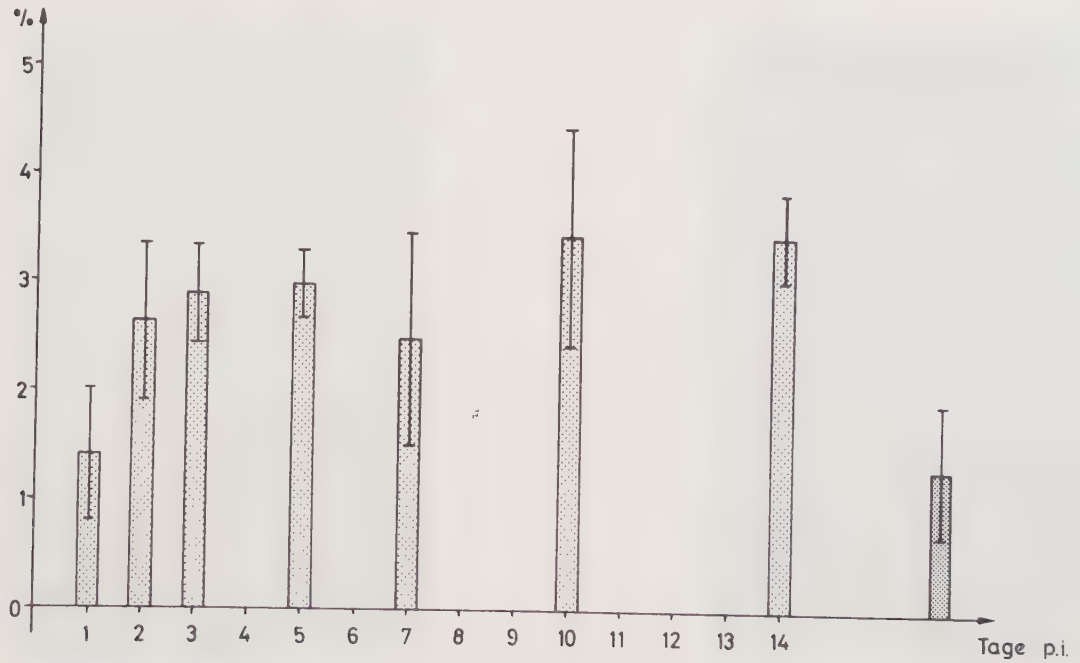
1


mg %
400
300
200
100
0
n=21
n=21
n=18
n=15
n=12
n=12
n=9
n=9
n=6
n=6
n=6
n=3
n=3
n=3
n=49
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Tage p.i.

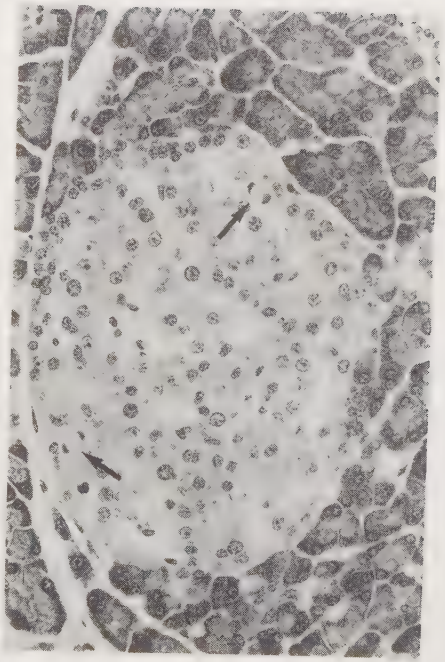
2

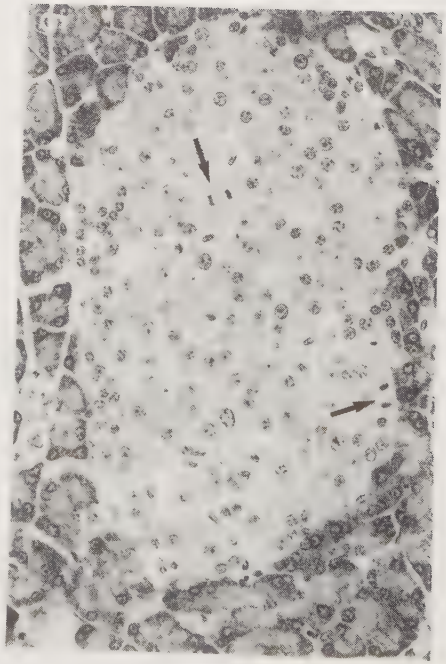

%
+10
100
-10
-20
n=28
n=7
n=6
n=5
n=4
n=4
n=3
n=3
n=2
n=2
n=2
n=1
n=1
n=1
n=20
n=17
n=14
n=11
n=11
n=8
n=8
n=5
n=5
n=5
n=2
n=2
n=2
n=2
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Tage p.i.

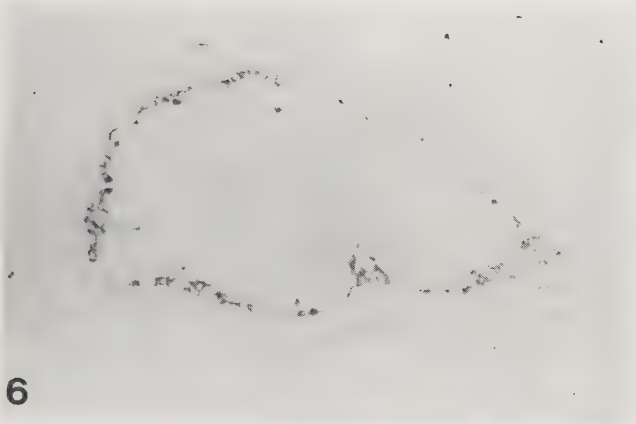
3



4

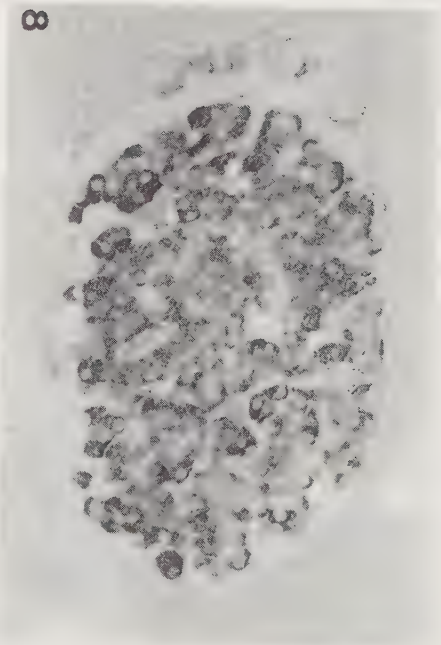


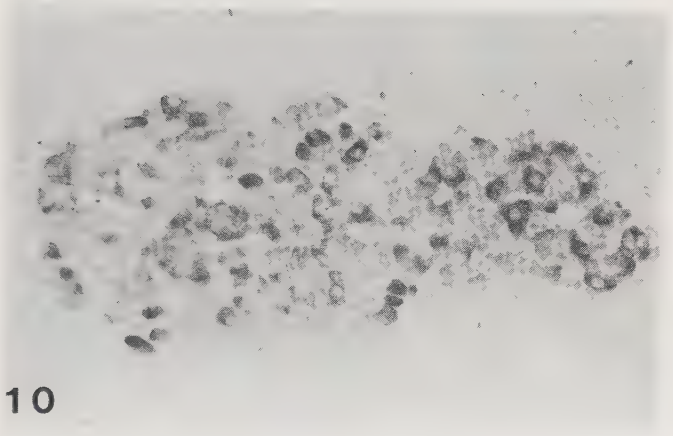




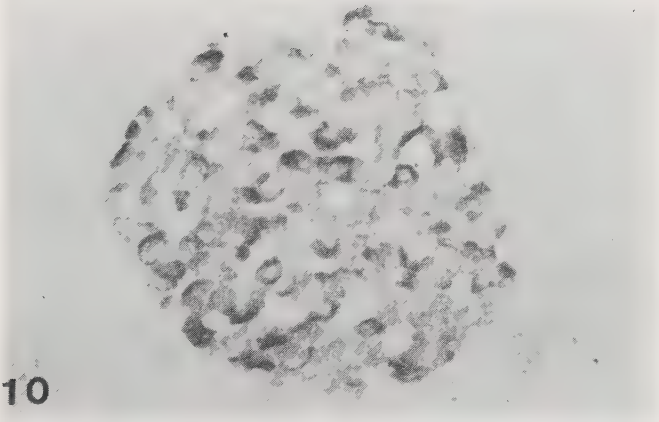
6

7

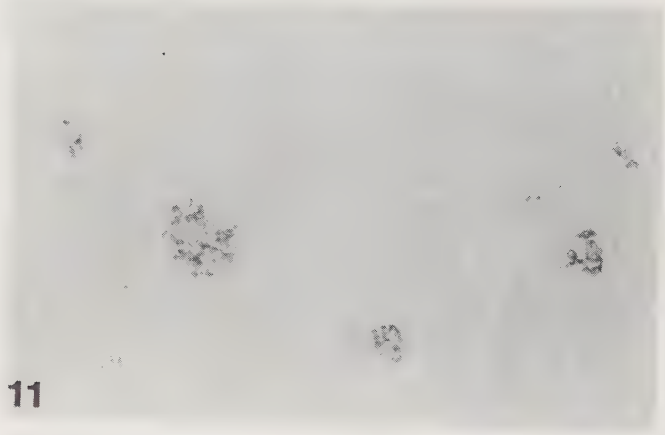




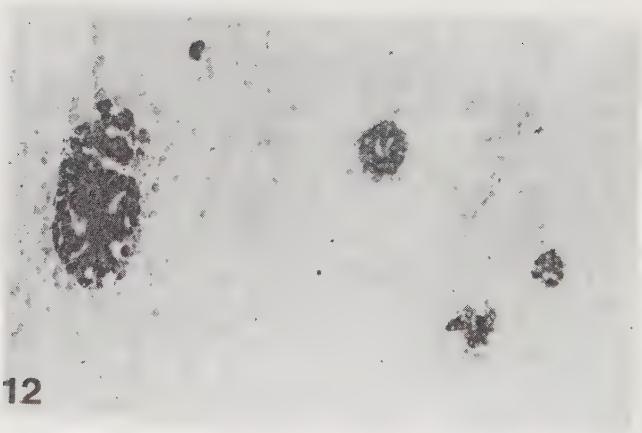
10



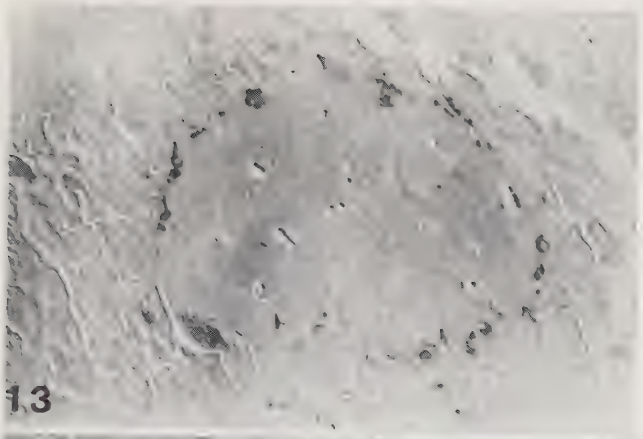
10



11



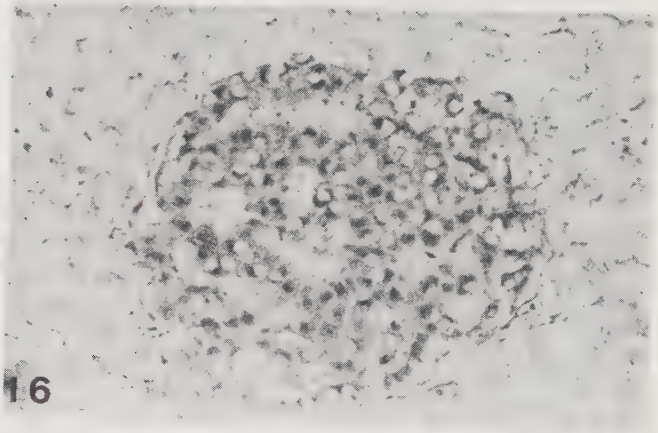
12



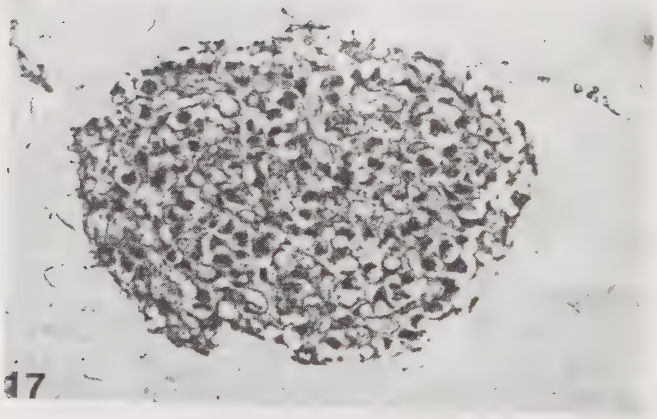
13

14

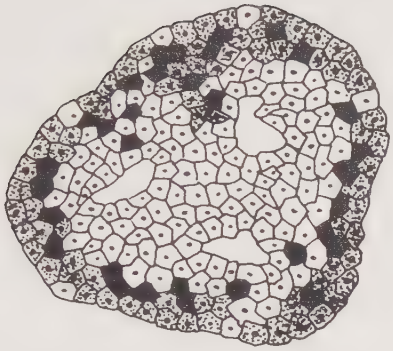
15



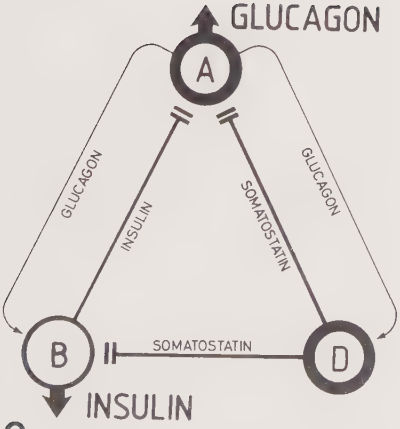
16



17



18


GLUCAGON
A
GLUCAGON
INSULIN
SOMATOSTATIN
GLUCAGON
B
SOMATOSTATIN
D
INSULIN

19

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.Ch.Klessen danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine stete Unterstützung beim Entstehen der Arbeit.
Herrn Prof.Dr.M.Arnold danke ich für seine großzügige Förderung.

Bei Frau E.Maier will ich mich für die Einarbeitung in die immuncytochemische, bei Frau B.Klaas in die histochemische Technik bedanken.

Frau B.Wendt-Schneider und Frau U.Krauss danke ich für die sorgfältige Herstellung des Manuskripts, Herrn P.Weber für seine sachkundige Hilfe bei der Herstellung der Fotos, Herrn M.Nicolescu für die Anfertigung der Zeichnungen.

Schließlich gilt mein Dank allen übrigen Mitgliedern des Anatomischen Institutes, die mir mit Rat und Tat beistanden.

Lebenslauf

Am 2. Februar 1952 wurde ich, Sonja Teichmann-Dörr, als Tochter des Rudolf Teichmann und der Anna Teichmann, geb. Donner, in Opava (früher: Troppau, CSSR) geboren. Von 1958 bis 1967 besuchte ich die Bürgerschule in Grätz bei Opava, ab 1967 die Mittelschule in Opava. Im Februar 1969 siedelte meine Familie in die Bundesrepublik Deutschland um. Nach Erlernen der deutschen Sprache trat ich im Herbst 1969 ins Gymnasium Unserer lieben Frau in Offenburg/-Baden ein, wo ich 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und setzte dieses ab 1977 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort. Das praktische Jahr absolvierte ich 1979/80 in Stuttgart-Bad Cannstatt. Nach Abschluß des Studiums der Humanmedizin am 21. April 1980 in Stuttgart,arbeitete ich bis 1981 als Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes an der Dermatologischen Klinik der Universität Bari/Italien.

1980 heiratete ich Georg Dörr aus Wolframs-Eschenbach, 1981 wurde unser Sohn Stephan Georg geboren. Von 1982 bis 1984 arbeitete ich als wissenschaftliche Angestellte am Anatomischen Institut der Universität Tübingen, im Laufe des Jahres 1984 fertigte ich dort meine Dissertation an. Seit September 1984 bin ich als wissenschaftliche Angestellte an der Dermatologischen Klinik der Universität Tübingen tätig.

Druck Köhler Tübingen